

**Zur Untersuchung der
Chlortetracyclinkonzentration
im Kälberserum nach Verabreichung
chlortetracyclinhaltiger
Milchaustauschfutter für die Kälbermast**

Gert Joachim Knall

1971



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Institut für Tierphysiologie und dem Institut
für Ernährungsphysiologie der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Vorstände: Prof. DDr.DDr.h.c. Johs. Brüggemann

Prof. Dr. Dr. Jürgen Tiews

ZUR UNTERSUCHUNG DER CHLORTETRACYCLINKONZENTRATION
IM KÄLBERSERUM NACH VERABREICHUNG
CHLORTETRACYCLINHALTIGER MILCHAUSTAUSCHPUTTER
FÜR DIE KÄLBERMAST

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde

der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

von

Gert Joachim Knall

aus

Kronstadt

München 1971

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen

Fakultät der Universität München



Dekan: Prof. Dr. Bernd Vollmerhaus

Referent: Prof. DDr. DDr. h.c. Johs. Brüggemann

Korreferent: Prof. Dr. Kurt Walser

Tag der Promotion: 2.7.1971

MEINER LIEBEN FRAU

UND UNSEREN ELTERN

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
I. EINLEITUNG	
I. 1. Antibiotica in der Fütterung	1
I. 2. Die Gruppe der Tetracycline	7
II. MATERIAL	
II. 1. Zur Methode	19
II. 2. Material	19
II. 3. Entnahme der Blutproben	26
II. 4. Haltung und Fütterung der Versuchstiere	27
III. ERGEBNISSE	
III. A. Chlortetracyclin-Serumspiegel nach Verabreichung von Perorison- bzw. Aurofac-haltigem Milchaustauschfutter (80, 100 und 400 mg CTC/kg MA)	31
III. B. Chlortetracyclin-Serumspiegel nach Verabreichung hoher CTC Dosen (1000 mg CTC p.o. und 300 mg CTC i.v.) und nach Intervallfütterung von 100 mg CTC/kg MA	35
III. C. Chlortetracyclin-Serumspiegel 20-130 Stunden nach Verabreichung und nach intraruminaler CTC Applikation	39
IV. DISKUSSION	43
V. ZUSAMMENFASSUNG	51
VI. SUMMARY	54
VII. ABBILDUNGEN	56
LITERATURVERZEICHNIS	57

I. EINLEITUNG

I. 1. Antibiotica in der Fütterung

Der erste Bericht über die wachstumsfördernde Wirkung eines Antibioticums wurde relativ wenig beachtet. Im Jahre 1946 versetzten M o o r e und Mitarbeiter (1) Kükendiäten mit Streptomycin in der Annahme, daß die bakteriostatische Wirkung des Antibioticums die Darmflora und damit deren Vitaminsynthese reduzieren würde. Anstatt der erwarteten Mangelercheinungen stellten die Autoren jedoch eine erhebliche Wachstumsbeschleunigung der Versuchstiere fest.

Auf der Suche nach neuen Vitamin B 12-Quellen stiessen S t o c k s t a d und Mitarbeiter 1949 (2) auf die Rückstände der industriellen fermentativen Aureomycingewinnung. Nach deren Verfütterung an Küken zeigte sich die von Moore et al. beobachtete Wachstumsförderung erneut in starkem Maße und konnte nicht allein über den mikrobiell bestimmbaren Vitamin B 12-Gehalt des verfütterten Pilzmycels aus Streptomyces aureofaciens erklärt werden. Das Antibioticum Aureomycin selbst erwies sich in der Folge als das wachstumsfördernde Prinzip in derartigen Tierversuchen, und man sprach fortan von einer "nutritiven Antibioticawirkung". In den folgenden Jahren wurde der nutritive Antibioticaeffekt in einer Vielzahl von Versuchen überprüft. Schon 10 Jahre nach Stockstads Publikation schreibt B r ü g g e m a n n (3),

daß eine vollständige Bibliographie der Arbeiten über die nutritive Wirkung der Antibiotica bereits über 2000 Titel enthalten müßte. Von den wichtigsten zusammenfassenden Arbeiten sollen die von J u k e s (4), S t o c k s t a d (5), L a s s i t e r (6), B r ü g g e m a n n und Z u c k e r (7) zitiert werden.

Der nutritive Antibioticaeffekt, eine Verbesserung nicht nur des Wachstums, sondern auch der Futterverwertung wurde bei allen untersuchten Tierarten und auch beim Menschen beobachtet. Das Ausmaß der Verbesserung scheint vor allem von drei Faktoren abhängig zu sein: dem Lebensalter, der Umwelthygiene und der Nahrungszusammensetzung. Am ausgeprägtesten ist die Wirkung meist in der Zeit des intensiven Jugendwachstums (Jungtieraufzucht und Jungtiermast), unter relativ ungünstigen Umweltbedingungen (hoher Tierbesatz, mangelhafte Stallhygiene) und bei nicht optimaler Nährstoffzusammensetzung der Futterr ration. Neben der Wachstumswirkung, die als "Mehransatz von Geweben normaler Zusammensetzung in der gleichen Zeiteinheit" definiert wird, kann eine Verringerung des Futteraufwandes pro erzeugte Einheit Fleischansatz, außerdem eine Verringerung der Aufzuchtverluste und eine geringere Variabilität im Bestand erzielt werden.

Während die grundsätzliche Wirkung der Fütterungsantibiotica unbestritten ist, wird der Wirkungsmechanismus heftig diskutiert. Der Ort der Wirkung und damit auch die Qualität des Effektes wird von einigen Autoren ausschließ-

lich im Darmlumen, von anderen vor allem in den Zellen des Gesamtorganismus gesucht.

Die Wirkung des Antibioticums äußert sich im Darmlumen durch eine graduelle Unterdrückung der Darmflora, wodurch der Nutztierorganismus entlastet wird. Experimentalfunde über ein 10 % - 20 % besseres Wachstum keimfreier Tiere im Vergleich mit konventionell gehaltenen Tieren sprechen dafür (8, 9). Manche Untersucher engen die Ursache derartiger Wachstumssteigerungen auf die Beeinflussung der Dünndarmbewohner ein (insbesondere von *Clostridium welchii*) (H a e n e l, 1959, (10)), bzw. weisen nach, daß sich der Antibioticumeffekt in einer Selektion "günstigerer" Keime ausdrückt (coliforme Keime und Laktobazillen nehmen zu, wobei sich das Verhältnis dieser Keimgruppen zugunsten der coliformen verschiebt) (11, 12, 13). Die Verschiebungen der Darmflora bedingen die festgestellten Einsparungen von Vitaminen (14, 15) aufgrund einer vermehrten enteralen Vitaminsynthese der "selektierten" Keime. Auch in der Zurückdrängung transaminaseproduzierender Bakterien wird eine indirekte Entlastung der betroffenen Nutztiere gesehen (16, 17).

Eine antibioticabedingte Selektion resistenter, mit geringerer Tenazität und Pathogenität ausgestatteter Enterobacteriaceae zuungunsten pathogener nicht antibiotica-resistenter Keime wird ebenfalls zur Begründung des nutritiven Antibioticaeffektes angeführt (J u k e s 1970, (18)). Nach J u k e s könnte somit die gefürchtete und viel diskutierte Resistenzbildung (19 - 24) der Darmflora zu einer

günstigeren Entwicklung der betroffenen Nutztiere führen. In diesem Zusammenhang kann auch die sogenannte Disease-level Theorie (C a t r o n 1954, (25)) in einem neuen Licht gesehen werden. Sie besagt, daß durch Verwendung der Fütterungsantibiotica ganz generell die krankmachenden Keime in der Stalleinheit zurückgedrängt werden, wovon dann auch die anderen im Stall stehenden, aber nicht mit Antibioticazusätzen gefütterten Tiere profitieren.

Der Wirkungsort der nutritiven Antibioticagaben wurde um so mehr im bakteriell besiedelten Darmlumen gesucht, als die ersten diesbezüglichen Untersuchungen an keimfreien Tieren keinen positiven Wachstumseffekt zur Folge hatten (26, 27). Trotzdem wird insbesondere von S c h o l e 1966 (28) der Wirkungsmechanismus der Antibiotica-fütterung vor allem in der Stimulierung des intermediären Stoffwechsels gesehen. Gerade an keimfreien Tieren, die als Kronzeugen für die rein antimikrobielle Wirkung des Antibiotica-effektes galten, konnten B r ü g g e m a n n und Mitarbeiter 1969 (29) nachweisen, daß künstlich gesetzte Wachstumsdepressionen durch Antibioticazulagen (10 ppm) abgefangen werden können (Stressdämpfung). Gleichzeitig werden durch Beeinflussung der NNR Aktivität die allgemeinen Abwehrkräfte des Organismus verstärkt (30).

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß die Wirkungsweise der Fütterungsantibiotica als komplexer Vorgang der aufgeführten Faktoren anzusehen ist.

Es ist nicht verwunderlich, daß die Erkenntnisse über die nutritive Wirkung der Antibiotica ihren praktischen Niederschlag in der Fütterungspraxis aller Länder mit hochentwickelter tierischer Veredelungserzeugung fand. Nahezu allen Mischfutterarten für die verschiedenen Abschnitte der Hühner-, der Schweine- und der Kälberaufzucht und -mast werden heute "Fütterungsantibiotica" unter Beachtung eines vom Bundesgesundheitsrat sanktionierten und futtermittelrechtlich festgelegten "Wirkstoffdosierungsrahmens" zugesetzt. In der Bundesrepublik sind für diese Zwecke folgende Verbindungen zugelassen: Aureomycin (Chlortetracyclin), Terramycin (Oxytetracyclin), Zinkbacitracin, Oleandomycin (letzteres auch in Kombination mit Oxytetracyclin als Taomyxin) und Flavomycin.

Im Vergleich zu therapeutischen Dosen kommen die nutritiv eingesetzten Antibiotica in sehr niedriger Konzentration zur Anwendung. In Alleinfuttermischungen für die Geflügel- und Schweinemast sind beispielsweise 5 bis 20 ppm (für Flavomycin gilt die Hälfte bis ein Viertel dieser Menge) zulässig. Nur in Starterfutter ("Küken- und Ferkelstarter") und in "Milchaustauschfutter für die Kälberaufzucht bzw. -mast" sind höhere Antibioticadosierungen, 60 - 80 bzw. 80 - 120 mg/kg Futtermischung, zugelassen. Aber auch die höchste zugelassene Fütterungsdosierung in Milchaustauschfutter, mit der eine Zufuhr von 2,4 mg Antibioticum pro kg Körpergewicht maximal in der Kälbermast erreicht werden kann, liegt noch weit unter einer therapeutischen Einzeldosis, die 20 - 25 mg Antibioticum pro kg Körpergewicht beträgt.

So gering auch die Antibioticadosierungen in der nutritiven Anwendung sind, die insgesamt für die Fütterung eingesetzten Antibioticamengen stellen doch beachtliche Quantitäten dar. Allein in der Bundesrepublik werden jährlich für diesen Zweck über 100 t Antibioticareinsubstanz verwendet. Der Einsatz von Rückständen der fermentativen Antibioticaproduktion (also industrieller Abfallprodukte) gehört heute der Vergangenheit an. Die Produktion spezieller Fütterungsantibiotica ist für die Industrie schon lange rentabel geworden. AUROFAC, ein ausschließlich für Fütterungszwecke verwendbares und PERCRISON, ein kristallines Chlortetracyclin stellen beispielsweise zwei standardisierte Fütterungsantibiotica dar. Ob diese beiden Chlortetracyclinpräparate nach peroraler Verabreichung an Mastkälber unterschiedliche Chlortetracyclinserumkonzentrationen hervorrufen, ist die Frage, die mit Hilfe der hier vorgelegten Ergebnisse beantwortet werden soll.

I. 2. Die Gruppe der Tetracycline

Im Jahre 1948 beschrieb *D u g g a r* (31) ein von ihm 1947 entdecktes neues Antibioticum unter dem Namen Aureomycin. Das Präparat wurde aus dem Filtrat von *Streptomyces aureofaciens* gewonnen und fiel vor allem durch sein breites antibakterielles Wirkungsspektrum, ein sogenanntes Breitbandspektrum, auf (s.S. 8).

Zwei Jahre später berichten *F i n l a y* et al. (32) über eine antibiotische Substanz, die sie aus *Streptomyces rimosus* isolierten und Terramycin nannten. Die beiden Präparate ließen aufgrund des nahezu identischen antibakteriellen Wirkungsspektrums, der Kreuzresistenz und der gemeinsamen physiko-chemischen Eigenschaften eine enge Verwandtschaft vermuten.

S t e p h e n s und seinen Mitarbeitern (33) gelang es, im Verlauf der Konstitutionsaufklärung, die Verwandtschaft von Aureomycin und Terramycin durch Klärung des chemischen Aufbaues zu beweisen. Chemisch handelt es sich im Falle des Aureomycins um ein chlorisches Tetracyclin (Chlortetracyclin) (s.S. 8).

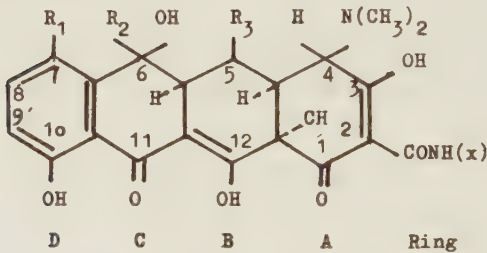
Im Zuge der weiteren Entwicklung wurde durch Hydrierung von Chlortetracyclin die Grundsatzsubstanz, das Tetracyclin, hergestellt. Später fand man noch die entsprechende *Streptomyces*-art (*Streptomyces texasi*, *Str. viridofaciens*, sowie Mutanten von *Str. aureofaciens*) zur direkten fermentativen Herstellung von Tetracyclin. In den Jahren 1957 bis 1959 wurden noch das Demethylchlortetracyclin und das Pyrrolidino-methyl-tetracyclin entwickelt.

I. 2. 1. Charakterisierung

Der Wirkungsbereich der verschiedenen Tetracycline umfaßt (34):

1. grampositive und gramnegative Kokken
2. die meisten gramnegativen Bakterien
3. grampositive Bakterien, Anaerobier, Sporenbazillen sowie Aktinomyceten
4. Spirochäten und Leptospiren
5. Rickettsien
6. die Gruppe der "großen Viren".

Überblick über die Gruppe der Tetracycline (34):



Tetracycline	Summenformel	Abkürzung	R ₁	R ₂	R ₃	(X)
Tetracyclin	C ₂₂ H ₂₄ N ₂ O ₈	TC	H	CH ₃	H	H
Oxytetracyclin	C ₂₂ H ₂₄ N ₂ O ₉	OTC	H	CH ₃	OH	H
Chlortetracyclin	C ₂₂ H ₂₃ N ₂ O ₈ Cl	CTC	Cl	CH ₃	H	H
Demethyltetracyclin	C ₂₁ H ₂₁ N ₂ O ₈ Cl. 1,5 H ₂ O	DMCT	Cl	H	H	H
Pyrrolidino-methyl-tetracyclin	C ₂₇ H ₃₃ N ₃ O ₈	PMT	H	CH ₃	H	CH ₂ -N(CH ₂ -CH ₂) ₂ -CH ₂ -CH ₂

I. 2. 2. Physikalische und chemische Eigenschaften des
Chlortetracyclins (35, 36)

Das Chlortetracyclin ist von goldgelber Farbe, hat eine fein kristalline Struktur und liegt in der Regel als frei-fließendes Pulver mit einem Schmelzpunkt von 168° - 169° C vor. Seine Löslichkeit in Wasser beträgt 0,5 - 0,6 mg/ml bei 25° C. Es ist in Methanol, Äthanol, Aceton schwer löslich, in Äther und Petroläther unlöslich.

Chlortetracyclin reagiert amphoter. Die phenolischen OH-Gruppen bedingen den sauren, die Dimethylamino-Gruppe in Position 3 den basischen Charakter.

In wässriger Lösung ist CTC nicht sehr stabil. Unter Einwirkung von Säuren und Laugen verändert es sich und verliert seine bakteriostatische Wirksamkeit, wobei die Empfindlichkeit in alkalischem Milieu besonders hoch ist. Durch Einwirkung verdünnter NaOH entsteht ein Isomer des CTC, das Iso-Chlortetracyclin. Hierbei ist der Ring "C" nicht geschlossen; zwischen C_6 und C_{11} befindet sich eine Sauerstoffbrücke. Mit konzentrierter HCl bei 60° C und einer Einwirkungsdauer von 30 Minuten entsteht das Anhydro-Aureomycin.

Mit Säuren kann CTC jedoch auch stabile Salze bilden, von denen das Hydrochlorid Bedeutung erlangt hat (s. Herstellung).

Chlortetracyclin kann mit Metallionen Verbindungen eingehen, die man Chelate nennt. Die Chelat-bildende Gruppe des CTC ist dabei die Carboxamid-Gruppe in C_2 . Die Komplexe mit Calcium und Kobalt sind besonders stabil (35).

I. 2. 3. Resorption des Chlortetracyclins

Nach peroraler Applikation wird Chlortetracyclin gut und rasch resorbiert. Bereits 30 Minuten nach Verabreichung können CTC-Blutspiegel erfaßt werden. Maximalwerte sollen nach Verabreichung an Menschen in 2-5 Stunden erreicht sein. Nach weiteren 5-6 Stunden sinken die im Blut bestimmten Höchstwerte auf die Hälfte (34). Chlortetracyclin gibt im Vergleich mit den anderen Tetracyclinen die höchsten Blutspiegel und ist am stärksten im Blut an die Plasmaproteine gebunden, ca. 47% verbleiben nach der Dialyse in dieser Bindung (R o b s o n und S t a c e y (37)).

Andererseits ist die Resorptionsgeschwindigkeit von CTC niedriger als von Tetracyclin und Oxytetracyclin (34). Die Antibiotica treten in alle Organe über. Chlortetracyclin passiert die Blut-Liquor-Schranke schwerer als Tetracyclin oder Oxytetracyclin (38). Besonders charakteristisch für die Tetracycline ist ihre Einlagerung in den Knochen und in das Dentin (39-41). Sie bewirkt eine vom Ausmaß der CTC-Bindung abhängige messbare Fluoreszenz betroffener Knochen-
teile im ultravioletten Licht und kann so leicht erkannt werden (42).

Daß es auch nach nutritiver Verabreichung von Chlortetracyclin zu Einlagerungen in den Knochen kommt, beschreiben B r ü g g e m a n n et al. (43) beim Kalb, Schwein und Geflügel. K n o t h e (44) verweist auf vergleichbare CTC-Gehalte in den Knochen von Kaninchen, denen CTC-haltiges Futter verabreicht wurde.

Die CTC-Fixierung im Knochenskelett ist in ihrer Intensität dosisabhängig und wird auch von der jeweiligen Stoffwechsellage des Skeletts bestimmt. So ist die Einlagerung in schnellwachsende Röhrenknochen beim jugendlichen Tier größer als im Brust- oder Kranialskelett. Die Epiphyse des Röhrenknochens als Zentrum der Knochenneubildung der wachsenden Röhrenknochen ist mehr betroffen als die bereits verkalkte Diaphyse. Aber auch beim voll erwachsenen Tier findet noch eine dosisabhängige CTC-Fixierung im Skelett statt (45, 47). Die Menge des im Knochen eingelagerten CTC wird mit Hilfe der antibakteriellen Wirksamkeit nach der Extraktion (mit salzsauerem Aceton, pH 1,1) bestimmt. Nach küchenmäßiger Zubereitung von Fleisch in Gegenwart CTC-haltiger Knochen konnte praktisch keine antibakterielle Aktivität im untersuchten Fleisch bestimmt werden (43, 44).

Auch im Magen-Darmtrakt sind CTC-Verbindungen mit dem Calcium von Bedeutung. Hier hemmt das gebildete CTC-Calciumchelat die Resorption (46, 47). Resorptionsfördernde Wirkung haben dagegen Zitronensäure, ein Tetracyclin-Phosphatkomplex, Glukosamin und Terephthalsäure (38). Die gesteigerte Resorption des Chlortetracyclins nach Zusatz solcher Hilfsstoffe wird zum Teil durch die Verbindung des "Hilfsstoffes" mit dem im Darm vorliegenden Calcium erklärt (Zitronensäure). Zum Teil ist es auch die Besetzung der Bindungsmöglichkeit für Calcium am CTC, so daß nach Verabreichung des Zusatzstoffes eine beschleunigte Resorption erfolgen kann. Terephthalsäure ist sowohl durch eine Senkung der renalen CTC Ausscheidungsrate als auch durch Besetzung der Bindungsmöglichkeit

für Calcium wirksam. Der Zusatz von Terephthalsäure und der Ersatz leicht löslicher Calciumverbindungen (CaCO_3) durch das schwerer lösliche, aber doch noch vom Tier nutzbare, CaSO_4 im Futter führt bei gegebener CTC-Konzentration zu höheren CTC-Blutspiegeln, ein Vorgang, der mit dem Begriff "Tetracyclinpotenzierung" umschrieben wurde (48). Bei wiederholten oralen Gaben von CTC kommt es zu Blutspiegelerhöhungen in Abhängigkeit von Dosierung und Dosierungsintervall. Die Beziehung zwischen zugeführter Dosis und Blutspiegelhöhe ist nur bis zu einer bestimmten Grenze linear, bei darüber hinausgehenden CTC-Dosierungen wächst die CTC-Konzentration des nicht resorbierten CTC in den Faeces unverhältnismäßig stark an (38). Nach oraler Applikation wird eine große individuelle Variationsbreite der Blutspiegel beobachtet. (34).

I. 2. 4. Ausscheidung

Der größte Teil oral verabreichter Chlortetracyclin-Gaben wird über die Faeces ausgeschieden (75 - 90 %). Die Ausscheidung über den Kot ist nach 48 Stunden praktisch abgeschlossen. Allerdings werden noch geringe Mengen CTC nach 72 Stunden gefunden; möglicherweise handelt es sich hier um endogene CTC-Ausscheidungen in das Darmlumen (46, 47, 49). Über die Nieren werden nach oraler Verabreichung von CTC etwa 10 - 25 % der zugefütterten Menge innerhalb der ersten 24 Stunden ausgeschieden, geringe Mengen findet man auch hier noch bis zur 70. Stunde im Harn (38).

1. 2. 5. Bestimmungsverfahren für Chlortetracyclin

(50, 51)

Die Bestimmung des Chlortetracyclins kann mit chemisch-physikalischen und mit mikrobiologischen Methoden vorgenommen werden.

Chemisch-physikalische Methoden, die zur Bestimmung von Chlortetracyclin angewandt werden:

- a. Ferrichlorid Kolorimetrie
- b. Säure Kolorimetrie
- c. Fluorometrie

Zu a: Die Methode der Eisen III-chlorid-Kolorimetrie wurde von M o n a s t e r o (52) empfohlen. Ihr liegt eine Farb-reaktion des Chlortetracyclins mit Eisen III-chlorid zugrunde. CTC bildet mit Ferrichlorid einen gelb-braunen Farbkomplex, dessen Extinktion bei der Wellenlänge 490 nm zur quantitativen Bestimmung des CTC in Konzentrationen von >50 mcg CTC/ml Reaktionsgemisch herangezogen werden kann.

Zu b: Unter Einwirkung von 2 n HCl bildet sich aus CTC das intensiv gelb gefärbte Anhydrochlortetracyclin, dessen Extinktion bei der Wellenlänge 440 nm ebenfalls zur quantitativen Bestimmung in Konzentrationen von >20 mcg CTC/ml herangezogen werden kann (L e v i n et al. (53)).

Zu c: Die Fluorometrie eignet sich für Chlortetracyclinbestimmungen im Blut und im Harn. Der Methode liegt die Fluoreszenz des Chlortetracyclins nach Elution mit heißer Soda-lösung zugrunde. Die blaue Fluoreszenz des Chlortetracyclins wird in einem Photofluorometer gemessen. Die Methode ist bei CTC-Gehalten $>0,25$ mcg CTC/ml anwendbar.

Der Nachteil dieser Methoden besteht in der geringen Empfindlichkeit, die um das 25 bis 5000-fache unter der der mikrobiologischen Methode liegt.

Im Rahmen der mikrobiologischen Methoden sind zwei Verfahren üblich:(50):

1. Turbidimetrie
2. Agar-Diffusion

Die Bestimmung des Chlortetracyclins mit Hilfe einer mikrobiologischen Methode fußt auf der antibakteriellen Wirksamkeit der Verbindung. Hierbei wird die Vermehrung eines CTC-empfindlichen Testkeimes (*Bacillus cereus*) in einem Nähragar durch steigende CTC-Konzentrationen in zunehmendem Maße unterdrückt.

Zu 1: Die turbidimetrische Methode beruht auf der Messung der durch Keimvermehrung hervorgerufenen Trübung eines Nährmediums. Bakteriostatisch wirksame, also wachstumshemmende Substanzen, z.B. Chlortetracyclin, verursachen eine geringere Trübung des Nähragars. Der Grad der Trübung des Nährmediums wird photometrisch im Vergleich zu einer Standardverdünnungsreihe ausgewertet.

Die turbidimetrische Methode sichert eine untere Nachweisgrenze von 0,06 mcg CTC/ml.

Zu 2: Die Diffusion des in Lösung gebrachten Chlortetracyclins kann im Agar-Diffusionstest zur Chlortetracyclin-Bestimmung herangezogen werden. Das Nährmedium wird mit einem für Chlortetracyclin empfindlichen Keim (z.B. *Bacillus cereus*) beimpft und in Agar-Platten gegossen. Das Chlortetracyclin wird in kreisrunden Reservoiren mit dem Agar in Kontakt gebracht, wodurch es radial in den Agar diffundiert. Nach dem

Bebrüten der Platten wird die bakteriostatische Wirkung des Chlortetracyclins durch den Größenvergleich kreisrunder Hemmhöfe, in denen keine Bakterien gewachsen sind, bestimmt. Der Durchmesser dieser Hemmhöfe ist dem Logarithmus der Konzentration des aufgetragenen Chlortetracyclins direkt proportional.

Die untere Nachweisgrenze dieser Methode liegt bei 0,01 mcg CTC/ml und hat eine Fehlergrenze von $\pm 20\%$ (54, 55). Die Empfindlichkeit der Methode ist dabei nach O b e r z i l l (56) von verschiedenen Faktoren abhängig:

- a. Art des verwendeten Teststammes
- b. physiologischer Zustand der Testkeime
- c. Einsaatdichte der Testkeime
- d. Bebrütungstemperatur
- e. Beschaffenheit des Nährmediums
- f. Agarschichtdicke und Art des Agars
- g. Form und Menge des zu untersuchenden Materials
- h. Art der Aufbringung des Hemmstoffes (Antibioticum), verwendete Konzentrationen.

Berücksichtigt man die Art der Materialauftragung zum Hemmstoffnachweis beim Agar-Diffusionsverfahren, so lassen sich vier Verfahrensweisen unterscheiden (55):

1. Gefrierblockverfahren
2. Plättchenverfahren
3. Zylinderverfahren
4. Lochtestverfahren.

Zu 1: Beim Gefrierblockverfahren wird gefrorenes Material auf die beimpften Nährböden gelegt.

Zu 2: Bei der Plättchenmethode werden Fliesspapierplättchen mit dem Untersuchungsmaterial getränkt und dann auf den beimpften Nährboden gebracht.

Zu 3: Das Zylinderverfahren wird in der Regel mit 10 mm hohen und im Innendurchmesser 6 mm weiten Zylindern aus rostfreiem Stahl oder anderem Material (Glas, Aluminium, Porzellan) durchgeführt. Die Zylinder werden auf die beimpfte Agarfläche gesetzt, und anschließend wird die zu untersuchende Flüssigkeit in die Zylinder pipettiert.

Zu 4: Das Lochtestverfahren dient zum Nachweis von Hemmstoffen, namentlich in viskösen Flüssigkeiten und Gallerten. Hierzu wird die zu untersuchende Flüssigkeit in bestimmter Menge in kreisrunde Löcher pipettiert, die zuvor aus der Agarfläche ausgestanzt wurden. (57).

Das zuletzt beschriebene Verfahren wurde in den vorliegenden Untersuchungen angewandt und wird im Detail unter "Material und Methode" (II) beschrieben.

I. 2. 6. Gewinnung von Chlortetracyclin

I. 2. 6. 1. Fermentation (58, 59)

Chlortetracyclin wird technisch in großen Stahlkesseln, die man als Fermenter bezeichnet, im sogenannten Submersverfahren hergestellt. Sporen des Chlortetracyclin und Vitamin B₁₂ produzierenden Stammes (*Streptomyces aureofaciens*) werden auf die Oberfläche eines mit Nährboden gefüllten Röhrchens überimpft (Oberflächenkultur). Die weitere Vermehrung der

Pilzkultur erfolgt durch Überimpfung des Pilzmycel auf flüssiges Nährmedium in sogenannte Vorimpftanks. Von hier aus gelangt das rasch wachsende Mycel als Inoculum (2-5%) in den mit Nährmedium vorbereiteten Hauptfermenter. Anzüchtung und Fermentation der Kulturbrühe dauern 6-8 Tage. Nach der Fermentation wird das Mycel von der Kulturflüssigkeit getrennt. Dies kann mit Hilfe von Walzenfiltern, großen mit Diatomeenerde (Adsorbens) beschichteten Siebwalzen, geschehen. Die Walze dreht sich durch den Behälter, gleichzeitig wird die Flüssigkeit durch die aufgetragene Schicht gesaugt. Die Beschichtung wird anschließend vorsichtig abgenommen. Diese Masse ist der sogenannte "Cake", der nur noch schonend getrocknet und dann gemahlen wird. Anschließend erfolgt die Beigabe von Trägersubstanzen (Stärke, Sojamehl, Maismehl bzw. CaCO_3 u.a.) und die Einstellung auf eine gewünschte Chlortetracyclin-Konzentration zur Abgabe an die Futtermittelindustrie. Das unter der Handelsbezeichnung AUROFAC in der Tierfütterung eingesetzte Chlortetracyclin ist ein auf diese Weise erzeugtes Präparat. Die Ausbeute dieses Verfahrens liegt heute bei etwa 5000 mcg CTC/ml Fermentationsgemisch.. Der Cake enthält 100 - 160 g CTC/kg. Als nicht unerwünschtes Nebenprodukt enthält der Cake noch Vitamin B 12.

Die Gewinnung von Chlortetracyclin als Futtermittelzusatz kann auch nach dem sogenannten Oberflächenverfahren vorgenommen werden. Hierbei wird auf groben Tassen ausgebreitetes, geschrotetes Getreide als festes Nährsubstrat für die Entwicklung von *Streptomyces aureofaciens* verwendet.

I. 2. 6. 2. Reindarstellung (58, 60)

Die Reindarstellung des Chlortetracyclins kann nach verschiedenen Methoden vorgenommen werden. Die Verfahren sind in einer Reihe von Patenten festgelegt. Das Antibioticum kann z.B. aus dem Mycel mit angesäuerten (pH 3,0 - 5,0) aliphatischen Alkoholen, wie Methanol oder Äthanol, eluiert werden. Der Auszug wird im Vakuum eingeeengt und in n-Butanol wieder extrahiert, der Extrakt mit Wasser ausgewaschen und auf ein kleines Volumen eingedampft. Das Antibioticum wird durch Zugabe von Äther ausgefällt. Zur Darstellung des Hydrochlorids wird das Antibioticum in 2 n HCl aufgenommen und das CTC-Hydrochlorid durch Gefriertrocknung gewonnen. Die einzelnen Verfahren der Reindarstellung unterscheiden sich hinsichtlich der benutzten Lösungsmittel sowie der verwendeten Fällsubstanzen. So kann die Lösung mittels Oxalsäure, die Fällung mittels Metallionen erfolgen.

Die Reindarstellung kann auch aus dem getrockneten Cake erfolgen. Hierbei wird das Chlortetracyclin mit Salzsäure oder Schwefelsäure extrahiert und danach in Butanol gelöst. Durch wiederholte Kristallisationsverfahren erhält man reines kristallines Chlortetracyclin. Dieses wird meist als Hydrochlorid in den Handel gebracht.

Die Herstellungsverfahren wurden deshalb beschrieben, weil in der vorgelegten Arbeit ein CTC-haltiger Cake (s. S. 17) (AUROFAC) mit einem kristallinen CTC-Präparat (PERCRISON) bezüglich der Blutspiegelwerte nach peroraler Verabreichung verglichen wird.

II. MATERIAL UND METHODE

II. 1. Zur Methode

Da wir ausschließlich die antibakterielle Wirkung des Chlor-tetracyclins im Blutserum erfassen wollten, bedienten wir uns der mikrobiologischen Agar-Diffusionsmethode, wie sie C o r e t t i (45) als Lochtest für Serum empfiehlt. Das Prinzip ist unter I. 2. 5. bereits geschildert worden.

II. 2. Material

II. 2. 1. Seren

Die Untersuchungen wurden mit den Seren der Versuchstiere durchgeführt (siehe unter II. 3.).

II. 2. 2. Nährböden

Antibiotic Medium 2 (Difco) von folgender Zusammensetzung:

Fleischextract	1,5 g
Hefe Extract	3,0 g
Peptone	6,0 g
Agar	15 g

25,5 g auf 1000 ml aqua dest.

II. 2. 3. Reagenzien und Standardlösungen

a. Phosphat-Lösung, pH 4,5

KH_2PO_4 13,6 g

Aqua dest. ad 1000 ml

b. Chlortetracyclin-Stammlösung:

50 mg CTC-Hydrochlorid ad 100 ml Phosphatlösung
pH 4,5 (500 mcg CTC/ml).

c. Chlortetracyclin-Bezugslösung (B):

Aus der CTC-Stammlösung wird durch weiteres Verdünnen
eine CTC-Konzentration von 0,05 mcg CTC/ml Phosphat-
lösung pH 4,5 hergestellt.

d. CTC-Standardverdünnungsreihe I (in Puffer):

Aus der Stammlösung (500 mcg CTC/ml) wird durch Ver-
dünnung mit Pufferlösung pH 4,5 eine Verdünnungsreihe
(z.B. Konzentrationen von 0,04; 0,1; 0,2; 0,4 mcg CTC/ml)
Puffer) hergestellt.

e. CTC-Standardverdünnungsreihe II (in Serum):

Zu den in Homogenisatorkölbchen pipettierten 4 ml eines
Kontrollserums (Serum eines antibioticumfrei gefütterten
Kontrolltieres) werden je 1 ml der Verdünnungsstufen der
CTC-Standardverdünnungsreihe I hinzu pipettiert. Dadurch
erhalten wir eine Verdünnungsreihe in Serum, die 1/4 der
Konzentration der Standardverdünnungsreihe I beträgt
(z.B. 0,01; 0,025; 0,05; 0,1 mcg CTC/ml). Die Konzen-
trationen der Verdünnungsreihen müssen so gewählt werden,
daß die Gehalte der zu untersuchenden Proben in dem Be-
reich der Konzentrationen der Standardverdünnungsreihe II
liegen. Letztere dient bei der Auswertung zur Darstellung
der Standardkurve.

II. 2. 4. Testkeim

Als Testkeim wird der von G r o v e und R a n d a l l
(50) angegebene, für Chlortetracyclin besonders empfind-
liche, *Bacillus cereus, variatio mydoides* ATCC 9634 ver-
wendet. Von diesem Keim wurde eine Sporensuspension als
Impfkultur hergestellt.

II. 2. 5. Geräte

Zentrifuge ,

Homogenisator nach Bühler,

Kölbchen für Homogenisator mit 25 ml Fassungsvermögen,

Rotationsverdampfer,

automatische Agardosierungspumpe,

steriplane Agarplatten (Petrischalen) mit einem Durchmesser von 8 cm,

Agarstanze.

II. 1. 1. Durchführung der Methode

In bereitstehende Homogenisierkölbchen werden je 4 ml der zu untersuchenden Serumproben pipettiert.

Um eventuelle nicht CTC-bedingte Wachstumshemmungen ausschließen zu können, bedient man sich einer "Nullprobe".

Hierzu werden 4 ml Serum eines antibioticumfrei gefütterten Kontrolltieres verwendet.

Alle in die Homogenisierkölbchen pipettierten Flüssigkeiten werden mit Phosphatlösung pH 4,5 auf 20 ml aufgefüllt.

In den Homogenisatorkölbchen befindet sich jetzt jeweils ein Gemisch von 20 ml:

- a. Serumproben mit unbekanntem CTC-Gehalt = P
- b. Standardverdünnungsreihe II (in Serum) mit bekanntem CTC-Zusatz = S
- c. Nullprobe aus CTC-freiem Serum = P₀

Nun werden alle unter a, b, c aufgezählten Proben 90 Sekunden unter Kühlung (Eiswasser) in einem Bühler-Homogenisator bei

3000 Umdrehungen pro Minute homogenisiert.

Anschließend werden die Proben 18 Stunden bei $+4^{\circ}\text{C}$ im Kühlschrank aufbewahrt.

Aus dem Kölbchen wird jede Probe in einen tarierten Kolben des Rotationsverdampfers umgefüllt und bei $+38^{\circ}\text{C}$ mit Unterdruck auf das Ausgangsvolumen von 4 ml eingeengt. Die Gewichtskontrolle des eingeengten Serums wird auf einer Laborwaage vorgenommen. Sollte zu stark eingeengt worden sein, so wird auf 4 g mit Phosphatlösung pH 4,5 aufgefüllt.

Agar, Antibiotic-medium 2, wird in aqua dest. gelöst (25,5 g/1000 ml) und zusammen mit der Dosierungspumpe und 500 ml aqua dest. zum Spülen des Pumpsystems autoklaviert. Der sterilisierte Agar muß auf $+60^{\circ}\text{C}$ abgekühlt sein, bevor 0,5 ml der Sporensuspension unter Einrühren darin homogen verteilt werden. Anschließend wird der Nährboden auf einer planen Glasfläche in die ebenfalls sterilisierten Petrischalen mit Hilfe einer automatischen Dosierungspumpe (8 ml:Platte) gegossen. Es entsteht so eine glatte Agarfläche von etwa 2 mm Stärke. Bis zum Erstarren des Agars werden die Platten auf der planen Glasfläche stehengelassen. Ist die Konsistenz des Agars genügend fest, werden die Löcher gestanzt und zwar über ein System Stanze-Saugflasche-Wasserstrahlpumpe. Die Stanze, ein angeschliffenes Metallrohr, ergibt einen Lochdurchmesser im Agar von 10 mm. Auf einer Platte werden 6 Löcher gestanzt.

Um individuelle Unterschiede im Wachstum der Bakterienkultur auf den einzelnen Platten ausgleichen zu können, bedient man sich der Bezugslösung (als reference point).

Man pipettiert 0,02 ml des Probenextrakts (P) und 0,02 ml der Bezugslösung (B) in je drei Löcher einer Platte. Für jede Serumprobe werden drei Platten pipettiert (Platten-gruppe). Dadurch erhält man neun Werte der Serumprobe und neun Werte der Bezugslösung.

Die pipettierten Platten werden für 16 Stunden in einem Brutschrank bei 30° C incubiert.

Die Durchmesser der Hemmhöfe, die sich durch die bakterio-statische Wirkung des in den Agar diffundierenden Chlor-tetracyclins als runde Flächen um die Löcher abzeichnen, werden auf einer gravierten Glasplatte im Durchlicht ge-messen.

Von den Hemmhofdurchmessern einer Probe und denen der zu-gehörigen Bezugslösung, also von je neun Werten, wird das arithmetische Mittel errechnet (= P, bzw. B). Das Mittel aller B - Werte eines Tests wird mit $\bar{B}$ bezeichnet. Die Differenz zwischen $\bar{B}$ und B einer jeden Probe wird ermittelt und zum jeweiligen P - Wert addiert. Der so gewonnene Wert wird als "angeglichener" (an den reference point angegliche-ner) P - Wert bezeichnet. Die S - Werte (Hemmhofdurchmesser der Standardverdünnungsreihe II) werden in der gleichen Weise angeglichen.

Auf halblogarithmischem Millimeterpapier werden die ange-glichenen Durchmesser der Hemmhöfe (S) linear, die CTC-Konzentrationen logarithmisch aufgetragen und dementspre-chend die Standardkurve eingezeichnet. Auf dieser Kurve wird aufgrund der angeglichenen Hemmhofdurchmesser der Proben (P) der Chlortetracyclin-Gehalt in mcg/ml Serum ab-gelesen.

Um den Aussagewert der Untersuchung zu erhöhen, wurden die Kontrollserumproben und solche Proben, deren antibakterielle Aktivität knapp über der unteren Erfassbarkeitsgrenze lagen, auf die Hälfte des Ausgangsvolumens eingeeengt und gegen einen entsprechenden Standard getestet. Zudem wurden von einem Serum zwei Extraktionen parallel ausgeführt (s. Beispiel).

Eine untere Erfassbarkeit von $0,01 \text{ mcg/ml}$ konnte so eindeutig gesichert werden.

Das Einengen der Proben von 20 ml auf 4 ml erübrigt sich, wenn zu erwarten ist, daß der CTC-Gehalt der Probe größer ist als $0,20 \text{ mcg/ml}$, so daß auch die nicht eingeeengte Probe deutliche Hemmhöfe gibt, wobei gegen eine entsprechende nicht eingeeengte Standardverdünnungsreihe II getestet wird. Der in diesem Fall bestimmte CTC-Gehalt wird wegen der 5-fachen Verdünnung mit dem Faktor 5 multipliziert.

Im folgenden Beispiel sind die Werte S einer Standardverdünnungsreihe II und die zugehörigen B-Werte eingetragen. Aus der Addition von $\bar{B} - B$ zu S ergibt sich der angegliche S - Wert.

Außerdem wird die Doppelbestimmung zweier Proben (I und II) und die Bestimmung einer Blindprobe gezeigt. Auch hier ergeben sich aus der Addition von $\bar{B} - B$ zum jeweiligen P die angeglichenen P - Werte, die, auf der Standardkurve abgelesen, die CTC-Gehalte direkt anzeigen.

Beispiel: Bestimmung des Chlortetracyclin-Gehaltes im Serum

Nr. der Platten- gruppe	Stand.- Verd. II mcg CTC/ml	S	B	$\bar{B} - B$	S angepl.
1	0,01	10,9	17,4	- 0,2	10,7
2	0,025	12,9	17,3	- 0,1	12,8
3	0,05	14,8	16,9	+ 0,3	15,1
4	0,1	18,2	17,4	- 0,2	18,0

$$\bar{B} = 17,2 \text{ mm}$$

Nr. der Platten- gruppe	Serum- probe	P	B	$\bar{B} - B$	P angepl.	Gehalt CTC mcg/ml Serum
5	I	13,9	17,2	0	13,9	0,033
6	I	13,7	17,3	- 0,1	13,6	0,030
7	II	16,8	17,0	+ 0,2	17,0	0,086
8	II	16,5	16,9	+ 0,3	16,8	0,080
9	P ₀	10,0	17,3	- 0,1	-	0

Erklärung der Abkürzungen:

Durchschnitt der Hemmhofdurchmesser der: S = Verdünnungsstufen der

Standardverdünnungsreihe II

"	"	"	"	B = Bezugslösung
"	"	"	"	$\bar{B}$ = Bezugslösung aller Platten
"	"	"	"	P = Serumproben
"	"	"	"	P ₀ = Nullprobe

S angeglichen: $S + (\bar{B} - B)$

P angeglichen: $P + (\bar{B} - B)$

II. 3. Entnahme der Blutproben

Einzelne Blutproben wurden direkt durch Punktieren der Vena jugularis mit Hilfe einer Kanüle entnommen. Da unsere Untersuchungen den Blutspiegelverlauf festhalten sollten, waren zum Teil stündliche Probeentnahmen nötig. Um eine wiederholte Venenpunktion zu vermeiden, wurde ein Dauerkatheter in die Vena jugularis eingelegt.

Hierbei wird zuerst das Operationsfeld rasiert und gereinigt. Eine Hilfsperson staut die Vene mit einem Staustrick, während vom Operateur die Vene mit einer starken Kanüle (Länge 10 cm, Durchmesser 3 mm) punktiert wird. Durch das Kanülenlumen wird ein Polyäthylenkatheter (Länge 30 - 40 cm, Durchmesser 2 mm) in Richtung Herz vorgeschoben. Bei richtigem Sitz beginnt das Blut aus dem Katheter zu tropfen. In diesem Augenblick wird auf das freistehende Ende des Katheters eine passende Kanüle (1691 C/4) aufgesetzt. Mit Hilfe einer Spritze, die ein Fassungsvermögen von 5 ml nicht überschreiten darf, da sonst der Druck bzw. Unterdruck im Verhältnis zum Lumen des Katheters zu groß ist, wird das Blut entnommen. Die gesammelte Menge Blut soll ca. 25 ml betragen und wird am besten gleich in Zentrifugengläschen aufgefangen. Nach Beenden der Blutentnahme wird physiologische Kochsalzlösung durch den Katheter gespült. Es muß darauf geachtet werden, daß in dem Katheter eine Flüssigkeitssäule der physiologischen Kochsalzlösung steht. Dadurch wird das Gerinnen des Blutes im Katheter verhindert. Das freistehende Ende des Katheters wird mit einem festsitzenden Stahl- oder Plastikstift verschlossen.

Befestigt wird das freistehende Ende des Katheters durch Anlegen eines Halsbandes aus Leukoplast. Zu diesem Zweck wird ein 5 cm breites Leukoplastband cranial und caudal der Eintrittsstelle des Katheters um den Hals des Tieres gelegt. Das Halsband darf nicht zu straff sitzen, da es sehr leicht zu Stauungsödemen kommt. Das noch immer freistehende Ende des Katheters wird in einer leichten Schleife mit einem Leukoplaststreifen auf das Halsband geklebt. Vor und nach jeder Blutentnahme wird der Katheter mit physiologischer Kochsalzlösung zur Verhinderung von Thrombenbildung sorgfältig durchgespült. Mit dieser Methode gelang uns eine Funktionserhaltung des Katheters bis zu 12 Tagen.

Folgende Schwierigkeiten, die auftreten können, sollen hier erwähnt werden: durch die Unruhe der Kälber kann es zum Verlust des Katheters kommen. Auch bei richtig befestigten Kathetern setzt nach ca. 5 Tagen eine "Fremdkörperwanderung" ein, der Katheter wird nach außen geschoben. Um dies zu verhindern, muß mehrmals täglich der Sitz des Katheters kontrolliert und gegebenenfalls korrigiert werden.

Die Blutprobe bleibt eine Stunde bei Zimmertemperatur stehen, wird dann in den Kühlschrank gegeben, spätestens nach sechs Stunden bei 2000 U.p.M. zentrifugiert und in 4 ml Portionen bei -20°C tiefgefroren.

II. 4. Haltung und Fütterung der Versuchstiere

Die Untersuchungen wurden an insgesamt 12 zugekauften männlichen Saugkälbern durchgeführt (4 Pinzgauer Kälber und 8 Höhenfleckvieh Kälber). Die Tiere wurden mit einem Gewicht von etwa 50 kg aufgestellt und bei 130 - 180 kg aus dem Versuch genommen. Der Versuchsstall enthielt fünf Einzelboxen aus Holz mit Lattenrosten, so daß keine Einstreu benötigt wurde. Die Tränkung aus dem Eimer erfolgte zweimal täglich (7^h, 17^h oder 6^h, 15^h) in Versuch III. B 3, dreimal täglich in achttündigem Abstand (8^h, 16^h, 24^h). Die Zahl der Chlortetracyclin-haltigen Tränken war von Versuch zu Versuch verschieden (s. Ergebnisse).

Das Milchaustauschfutter wurde in eigener Mischanlage hergestellt und hatte folgende Zusammensetzung:

Trockenmagermilch (Walzenpulver)*	68
Magermilch Fettkonzentrat	30
Aufgeschlossene Stärke	1,1
NaCl	0,3
CaHPO ₄	0,15
MgO	0,15
CaCl ₂	0,1
Vitaminvormischung und	
Spurenelemente**	0,2
	100%

* Das Magermilch Fettkonzentrat hatte folgende Zusammensetzung:

Magermilchpulver	73,3
Gehärtetes Fischöl	12,0
Rindertalg	8,0
Kokosfett	4,5
Sojaöl	1,4
Sojalezithin	0,8
	100%

* * Die Vitaminvormischung (auf Maisstärke) enthält in 2 g
(= pro kg der fertigen Mischung):

Vitamin A	24000 I.E.
Vitamin D ₃	11000 I.E.
Vitamin E	50 mg
Vitamin C	150 mg
Vitamin B ₁	2 mg
Vitamin B ₂	5 mg
Pyridoxin	2 mg
Eisensulfat (als $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$) =	200 mg
Mangansulfat (als $\text{MnSO}_4 \cdot 1 \text{H}_2\text{O}$) =	50 mg
Zinksulfat (als $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$) =	50 mg
Kupfersulfat (als $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$) =	40 mg
Molkenpulver	ad 2000 mg

In den Versuchen entsprach die täglich zugemessene Menge Milchaustauschfutter obiger Zusammensetzung 2% des jeweiligen Tierkörpergewichts und wurde, sofern nicht anders angegeben, gleichmäßig auf die Morgen- und Abendmahlzeit verteilt. Hierzu wurde Milchaustauschfutter für jüngere Kälber in einer Konzentration von 100 g/l, bei älteren Kälbern zunehmend bis 150 g/l in 38° C warmen Wasser mit dem Schneebesen verrührt und unmittelbar darauf aus dem Tränkeimer verfüttert.

Da die Tiere nach der Anlieferung durch den Orts- und Futterwechsel sehr gefährdet und teilweise klinisch erkrankt waren (Bronchitis und Diarrhöe), wurden die Mengen Milchaustauschfutter in der Übergangszeit unterschritten und in Kamillenaufguß gelöst. Die Übergangszeit betrug ca. 7 Tage, in denen keine Versuche durchgeführt wurden.

Jeweils 100 kg Chargen des Milchaustauschfutters (MA) wurden mit:

- a. AUROFAC 40 (40% Fermentationscake gebunden an 60% extrahiertes Sojaschrot als Trägerstoff. Analysenwert 41,5 g CTC/kg $\pm$ 10%)
- b. PERCRISON 40 T (4% Chlortetracyclin kristallisiert mit 96% Traubenzucker als Trägersubstanz. Analysenwert 40,6 g CTC/kg $\pm$ 10%)

auf Gehalte von 80; 100; bzw. 400 mg CTC/kg MA eingestellt, und der Sollgehalt anschließend mikrobiologisch überprüft.

Vor Beginn eines jeden Versuches erhielten die Kälber mindestens 7 Tage lang CTC-freies Milchaustauschfutter. Auf diese Weise konnten antibakterielle Serumaktivitäten aus den vorangegangenen CTC-Versuchen ausgeschlossen werden.

Die zu Beginn eines jeden Versuches getesteten Serumproben waren in jedem Falle negativ ($< 0,01$ mcg CTC/ml Serum).

III. ERGEBNISSE

Versuchsabschnitt A:

Der Versuchsabschnitt A umfaßt Untersuchungen, die sich mit dem Vergleich der beiden Chlortetracyclin-haltigen Präparate, AUROFAC und PERCRISON hinsichtlich der An- und Abflutung der Serumspiegel befassen.

Die praxisübliche Chlortetracyclinkonzentration in der Kälberfütterung mit Milchaustauschfutter (MA) für die Kälbermast liegt in der Bundesrepublik zwischen 60 mg CTC/kg MA und 120 mg CTC/kg MA.

In unseren Untersuchungen haben wir aus diesem Bereich zwei Konzentrationen (80 mg/kg und 100 mg/kg) ausgewählt. Zudem wurde noch ein Versuch mit einer Chlortetracyclin-Konzentration von 400 mg/kg MA durchgeführt. Für jeden Versuch wurden zwei Milchaustauschfutter gleicher Zusammensetzung hergestellt, wobei dem einen AUROFAC 40, dem anderen PERCRISON 40 T in entsprechender Konzentration (80 mg CTC/kg, 100 mg CTC/kg, 400 mg CTC/kg) zugemischt wurde.

III. A. 1. Einmalige Fütterung von 80 mg CTC/kg

Milchaustauschfutter (Abb. 1 und 2)

Der Versuch wurde mit Percrison- und mit Aurofac-haltigem Milchaustauschfutter an jeweils vier Kälbern durchgeführt. Dabei wurden zuerst pro Futtermischung zwei Tiere untersucht. Nach einer Pause von 7 Tagen wurde diese parallele Versuchsanordnung wiederholt.

Abbildung 1 stellt die Serumspiegel der Percrison-gefütterten Tiere (Pe) dar, Abbildung 2 zeigt die Ergebnisse des Ver-

gleichsproduktes Aurofac (Au). Die Kurvenlinie stellt die arithmetischen Mittelwerte der CTC-Serumspiegel dar.

In Abbildung 1 steigt die Kurve steiler an als in Abbildung 2. Der maximale CTC-Serumspiegel wird 5 - 7 Stunden nach der Fütterung erreicht. Bei dieser Dosierung werden Werte um 0,10 mcg CTC/ml für Pe. bzw. um 0,09 mcg CTC/ml für Au. erreicht.

Das Abfluten der Serumspiegel verläuft auf Abbildung 1 und 2 sehr ähnlich. Nach 16 Stunden wird ein Wert von 0,04 - 0,03 mcg CTC/ml Serum erreicht.

III. A. 2. Einmalige Fütterung von 100 mg CTC/kg Milchaustauschfutter (Abb. 3 und 4)

5 Kälber erhielten "Milchaustauschfutter Au".einmalig in der Morgenfütterung; der CTC-Spiegel im Serum wurde anschließend untersucht. Nach 7-tägigem CTC freiem Fütterungsintervall wurde der gleiche Versuch mit "Milchaustauschfutter Pe" wiederholt.

In Abbildung 3 und 4 sowie in Abbildung 1 und 2 ist der Kurvenverlauf nahezu identisch.

Percrison bleibt im Höchstwert mit 0,12 mcg/ml Serum nach 6 Stunden um 0,02 mcg/ml Serum unter dem Wert des Aurofac (0,14 mcg/ml). Das Abfluten zeigt bis auf den Endpunkt nach 20 Stunden (0,02 mcg/ml bzw. 0,03 mcg/ml) in der Tendenz keinen Unterschied.

Die Körpergewichte der in III. A. 1. und III. A. 2. untersuchten Tiere lagen zwischen 80 kg und 120 kg. Die CTC-Zufuhr betrug in III. A. 1. 0,8 mg/kg Kgw. und in III. A. 2. 1,0 mg/kg Kgw.

III. A. 3. Einmalige Fütterung von 400 mg CTC/kg
Milchaustauschfutter (Abb. 5 und 6)

Da die untersuchten Tiere in diesem Versuch ein Körpergewicht von 50 kg hatten, beträgt die aufgenommene Futtermenge 500 g pro Mahlzeit. Die somit aufgenommene Menge CTC beträgt 200 mg pro Mahlzeit, entsprechend 4 mg CTC/kg Körpergewicht. Der Versuch wurde an jeweils vier Tieren pro Futtermischung vorgenommen.

Die Kurvenzüge in Abbildung 5 und 6 decken sich fast völlig. Hatte sich bisher im Kurvenanstieg noch ein Unterschied zwischen beiden Präparaten angedeutet, so ist er in Abbildung 5 und 6 nicht mehr vorhanden. Der Höhepunkt der Kurven liegt auch bei dieser stark überhöhten Chlortetracyclin-Dosierung 5 bis 7 Stunden nach der Fütterung. Percrison erreicht einen Durchschnittswert von 0,29 mcg CTC/ml, Aurofac einen solchen von 0,31 mcg CTC/ml.

Nach 24 Stunden ist in beiden Fällen noch ein Gehalt von 0,05 mcg CTC/ml Serum zu erfassen.

III. A. 4. 100 mg CTC/kg Milchaustauschfutter zweimal
täglich (dadurch 2 mg CTC/kg Kgw. und Tag)
über 6 Tage verabreicht (Abb. 7)

In der Praxis erfolgt die Verabreichung von Chlortetracyclin-haltigem Milchaustauschfutter über die ganze Mastperiode. Um die Serumspiegel bei einer Verabreichung über einen längeren Zeitraum zu verfolgen, wurde vorliegender Versuch in zwei Serien durchgeführt. In der ersten Serie wurden zwei Tiere

mit "Milchaustauschfutter Au." und drei Tiere mit "Milchaustauschfutter Pe." gefüttert. Nach einer 7-tägigen CTC-freien Fütterungsperiode wurde der Versuch in Serie 2 mit nun gegeneinander ausgetauschten Tieren wiederholt.

Die Chlortetracyclin-Serumkonzentration steigt bei Verabreichung des Milchaustauschfutters Au. nach der zweiten Mahlzeit auf 0,21 mcg/ml an, bleibt über drei Mahlzeiten bei 0,18 - 0,19 mcg/ml, um nach der siebten Mahlzeit auf 0,12 mcg/ml abzusinken. Anschließend ist ein neuer Anstieg und ein Einpendeln am 4. Tag auf Werte um 0,15 mcg/ml zu verzeichnen. Das Serum der mit Milchaustauschfutter Pe. gefütterten Tiere erreicht seinen Höchstwert erst nach der 6. Mahlzeit mit 0,18 mcg/ml, pendelt sich jedoch ebenfalls am 4. Tag auf Werte um 0,15 mcg/ml ein. 30 Stunden nach der letzten Verabreichung sowohl des Pe. als auch des Au. enthaltenden Milchaustauschfutters werden 0,03 mcg CTC/ml Serum bestimmt.

Versuchsabschnitt B:

Im Versuchsabschnitt B wurde nur noch Percrison 40 T eingesetzt. Die einmaligen Dosierungen betrugen 1000 mg CTC pro Tier peroral (III. B. 1.) und 300 mg CTC pro Tier intravenös (III. B. 2.). Im Versuch III. B. 3. wurde die Auswirkung einer Intervallfütterung auf die CTC-Serumspiegel überprüft.

III. B. 1. 1000 mg Percrison 40 T pro Kalb,

peroral verabreicht (Tab. 1)

Dieser Versuch soll einen Vergleich der Höhe der Chlortetracyclin-Serumspiegel nach therapeutischer Dosierung von 1000 mg CTC/Tier zu den Serumspiegeln der vorangegangenen Versuche ermöglichen.

1000 mg CTC wurden dem Morgentrank der einzelnen Tiere zuge-mischt. Die nächstfolgenden Fütterungen wurden mit CTC-freiem MA durchgeführt.

Die Ergebnisse dieses Versuches wurden in Tabelle 1 dargestellt; daraus ist ersichtlich, daß die Körpergewichte der in diesem Versuch herangezogenen Tiere sehr unterschiedlich waren. Im Serum dieser Kälber wurden in der 7., 16., 24., 32., 48. Stunde nach Verabreichung der 1000 mg Pe. folgende Durchschnittswerte gemessen: 1,17; 0,83; 0,54; 0,16; 0,09 mcg/ml. (Einzelwerte s. Tab. 1). Besonders deutlich treten bei dieser Dosierung die individuellen, von der absoluten Dosierung relativ unabhängigen Unterschiede hervor (Tab. 1).

Tabelle 1

Nr.	Körperge- wicht d. Tiere	mg CTC pro kg Kgw.	Gehalt an CTC in mcg/ml Serum				
			Stunden nach Verabreichung				
			7.	16.	24.	32.	48.
1	120 kg	8,3	0,65	0,45	0,28	0,08	0,04
2	100 kg	10,0	1,90	1,20	0,70	0,24	0,11
3	80 kg	12,5	0,50	0,40	0,35	0,07	0,06
4	74 kg	13,6	2,10	1,50	0,90	0,20	0,14
5	70 kg	14,3	0,70	0,60	0,50	0,23	0,09

CTC-Serumspiegel nach Verabreichung von 1000 mg CTC/Tier (p.os)

III. B. 2. 2 mg CTC/kg Körpergewicht (300 mg CTC/Tier)

intravenös (Abb. 8)

In diesem Versuch soll der unterschiedliche Kurvenverlauf der Serumspiegel nach intravenöser und peroraler Verabreichung dargestellt werden. Der Abbildung 8 wurden als Beispiel der peroralen Verabreichung die Werte der Versuche III. A. 1. und III. A. 3. zugrunde gelegt.

Die 2 mg Pe./kg Körpergewicht wurden in steriler physiologischer Kochsalzlösung gelöst und zwei Versuchstieren in die Vena jugularis injiziert. Aus Abb. 8 kann man ersehen, daß die Abflutung der Serumspiegel nach einer intravenösen Gabe in den ersten 16 Stunden sehr rasch verläuft. Es wurden bei zwei Tieren zwei Stunden nach Verabreichung Werte um 0,70 mcg

CTC/ml nachgewiesen. Der Endpunkt unserer Messung liegt nach 24 Stunden bei 0,01 mcg CTC/ml.

III. B. 3. CTC-Serumspiegel nach zwei- bzw. dreimaliger
Fütterung pro Tag (Abb. 9)

Eine weitere Versuchsanordnung sah folgendermaßen aus: Zwei Kälber erhielten 100 mg CTC/kg Milchaustauschfutter in einer Menge von 2 % des Körpergewichtes pro Tag in zwei Mahlzeiten, um 6^h und 15^h verabreicht. Zwei andere Kälber dieser Versuchsgruppe erhielten dieselbe Menge Chlortetracyclin über das in drei gleich großen Portionen gefütterte Milchaustauschfutter, um 8^h, 16^h und um 24^h; der Versuch erstreckte sich über eine Zeit von fünf Tagen.

Nach diesem Versuch sah es so aus, als ob das Fütterungsintervall einen Einfluß auf die Höhe der Chlortetracyclin-Serumkonzentrationen haben würde. Diejenigen Kälber, denen 100 mg CTC/kg MA in zwei Mahlzeiten verabreicht wurden, hatten einen niedrigeren Chlortetracyclin-Serumspiegel als die Kälber, denen dieselbe Menge CTC-haltigen Futters in drei Mahlzeiten verabreicht wurde. (durchschnittlich 0,18 mg/ml zu 0,30 mg/ml). Das hätte bedeutet, daß man mit kleineren CTC-Mengen, die mehrmals am Tage verabreicht werden, gleich hohe Serumspiegel hervorrufen kann, wie mit größeren Mengen Chlortetracyclin, die zweimal am Tage verabreicht werden.

Daraufhin wurde der Versuch an einer anderen Tiergruppe wiederholt. Da diesmal fünf Kälber zur Verfügung standen,

wurden die Tiere in zwei Gruppen (zwei Tiere und drei Tiere) geteilt. Der Versuch wurde in gleicher Weise wie oben durchgeführt. Nach einer 7-tägigen CTC-freien Fütterung wurde der Versuch wiederholt, so daß alle fünf Tiere mit beiden Verabreichungsfolgen untersucht wurden.

Die in Abbildung 9 dargestellten Kurven resultieren somit jeweils aus den Untersuchungen an sieben Tieren.

Nach diesen umfassenderen Untersuchungen kann gesagt werden, daß die "dreimal Fütterung" am zweiten Tag höhere Serumspiegel ergibt als die "zweimal Fütterung" (0,22 mcg CTC/ml bzw. 0,16 mcg CTC/ml). Am dritten Tag wurden bei beiden Versuchsgruppen Serumspiegel um 0,20 mcg CTC/ml erfasst. Danach sinken die Serumspiegel aller Versuchstiere auf ein durchschnittliches Niveau von 0,15 mcg CTC/ml mit Schwankungen ($\pm 20\%$) um diesen Wert, ähnlich wie im Versuch III.A.4 (Vergleich von Percrison und Aurofac, zweimal täglich gefüttert) und Abbildung 7.

Versuchsabschnitt C:

In diesem Teil der Arbeit werden die Serumspiegel im Zeitabschnitt 20. bis 130. Stunde nach der letzten CTC-Gabe (100 mg CTC/kg MA) nach länger andauernder CTC-Beifütterung untersucht (III. C. 1), weil in allen vorangegangenen Versuchen bei deren Abbruch (vgl. Abb. 1 - 6) noch eine CTC-Restaktivität ($>0,01$ mcg/ml) im Serum nachweisbar war.

III. C. 1. CTC-Serumspiegel zwischen der 20. und 130. Stunde
nach der letzten Mahlzeit (Abb. 10)

Im Verlaufe der Untersuchungen wurde festgestellt, daß der Wert 0,01 mcg CTC/ml Serum nach der letzten Verabreichung von 100 mg CTC/kg MA oft 20 - 24 Stunden nach der letzten CTC-haltigen Fütterung noch nicht erreicht war. Es wurde deshalb der Zeitabschnitt von der 20. Stunde bis zur 130. Stunde nach der Fütterung genauer untersucht. Dabei zeigte sich, daß die CTC-Serumspiegel in diesem Zeitabschnitt erheblichen Schwankungen unterliegen. Versuchstiere, deren Serumspiegel bereits unter den Grenzwert 0,01 mcg CTC/ml abgefallen war, konnten wenige Stunden später erneut Chlortetracyclin-Serumkonzentrationen über 0,01 mcg/ml zeigen. Die häufigsten Schwankungen lagen dabei um Werte zwischen 0,01 mcg/ml und 0,04 mcg/ml. Bei insgesamt 236 Serumproben, die zwischen der 20. und 130. Stunde entnommen wurden, ergab sich folgende Verteilung:

13 Proben mit einem Gehalt von 0,10 - 0,20 mcg CTC/ml Serum
117 Proben mit einem Gehalt von 0,01 - 0,09 mcg CTC/ml Serum
106 Proben mit einem Gehalt von <0,01 mcg CTC/ml Serum.

In dem hier untersuchten Zeitabschnitt wiesen sowohl Kälber mit einem Körpergewicht <75 kg als auch Kälber mit einem Körpergewicht von >120 kg keine Chlortetracyclin-Serumwerte von >0,01 mcg CTC/ml auf. Von den langanhaltenden Serumspiegeln wurden also Tiere mit Körpergewichten zwischen ca. 75 und 120 kg betroffen.

Tabelle 2:

Std. nach Absetzen	20-25	26-30	31-35	36-40	41-45	46-50	51-55	56-60	61-65
^{mcg} CTC/ml	0,031	0,025	0,018	0,06	<0,01	0,028	0,024	0,024	0,046
± S %	35 %	48 %	71 %	108%	118%	60 %	117%	116%	109%
n	10	6	5	9	6	6	23	33	22

Std. nach Absetzen	66-70	71-75	76-80	81-85	86-90	91-99	100-120	120-130
^{mcg} CTC/ml	0,036	0,027	0,036	0,035	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
± S %	115%	140%	97 %	72 %	172%	132%	190%	167%
n	23	28	18	12	10	8	9	8

n = Zahl der untersuchten Serumproben.

S % = Variationskoeffizient

CTC-Serumspiegel zwischen der 20. und 130. Stunde nach Absetzen des CTC-haltigen Milchaustauschfutters (100 mg CTC/kg). Konzentrationen <0,01 mcg CTC/ml Serum wurden rechnerisch als 0 angesetzt.

In Abbildung 10 sind die Ergebnisse der Tab. 2. in Form einer Kurve dargestellt.

Um die ungewöhnlichen Schwankungen dieser langanhaltenden CTC-Serumspiegel zu erklären, wurde nachstehender Versuch (III. C. 2) durchgeführt.

III. C. 2. Bestimmung der CTC-Serumspiegel nach Verabrei-
chung von Percrison 40 T mit einer Magenschlund-
sonde in den Pansen

a. Drei Kälbern mit einem Kgw. von 68 - 75 kg wurden je 0,4 mg Percrison/kg Kgw. in 50 ml aqua dest. mit Hilfe einer in den Pansen eingeführten Magenschlundsonde verabreicht. Wie aus Tab. 3 hervorgeht, kommt es nicht zu einer Verlaufskurve mit deutlich erkennbarem An- und Abstieg, sondern zu einem langanhaltenden Plateau. Nach 48 Stunden, dem letzten Messpunkt des Versuches, war immer noch eine CTC-Restaktivität im Serum nachzuweisen, obgleich zwischenzeitlich die CTC-Werte schon unter die Erfassbarkeitsgrenze (0,01 mcg/ml) gefallen waren. Die CTC-Konzentrationen von durchschnittlich 0,02 mcg/ml Serum bleiben mit geringfügigen Schwankungen von der 6. bis 48. Stunde (nach CTC-Verabreichung in den Pansen) bestehen.

CTC-Serumkonzentration nach Verabreichung in
Tabelle 3: den Pansen von 0,4 mg CTC/kg Körpergewicht.

Nr.	Körper- gewicht d.Tiere kg.	CTC-Gehalt in mcg/ml Serum Stunden nach Verabreichung							
		2	4	6	8	10	12	16	
1	75	0,04	0,03	0,03	0,02	0,03	0,02	0,03	
2	69	0,03	0,03	<0,01	0,02	0,03	0,01	0,03	
3	68	<0,01	0,03	0,02	<0,01	<0,01	<0,01	0,01	

		20	24	30	36	42	48
1	75	0,01	0,04	0,02	0,02	0,01	0,01
2	69	0,02	0,03	0,03	0,03	0,02	0,02
3	68	0,03	0,03	0,03	<0,01	0,02	0,02

b. Nach der gleichartigen Verabreichung einer zehnmal höheren Chlortetracyclin-Dosis (4 mg CTC/kg Kgw.) an 5 Kälber intraruminal per Schlundsonde wurde die in Abbildung 11 dargestellte Verlaufskurve erhalten.

Dabei wurde folgendes festgestellt:

1. Nach intraruminaler CTC-Infusion treten die maximalen Serumspiegel der einzelnen Versuchstiere zu verschiedenen Zeitpunkten auf (19. bis 24. Stunde nach CTC-Verabreichung in den Pansen).
2. Die maximalen Serumwerte nach der intraruminalen Infusion liegen mit 0,13 mcg CTC/ml Serum unter den Werten in Abbildung 5 und 6 (ca. 0,30 mcg/ml Serum), die nach Aufnahme vergleichbarer CTC-Mengen mit dem Milchaustauschfutter ermittelt wurden.

IV. DISKUSSION

Diskussion des Versuchsabschnittes A

Vergleich zwischen AUROFAC und PERCRISON

Die eingangs gestellte Frage, ob nach peroraler Verabreichung in vergleichbarer Dosierung die Tetracyclin-Präparate AUROFAC bzw. PERCRISON im Serum unterschiedliche Chlortetracyclin-Konzentrationen ergeben würden, kann nach den durchgeführten Untersuchungen dahingehend beantwortet werden, daß praktisch keine Unterschiede in der Anflutung und Abflutung des Chlortetracyclins im Blutserum festzustellen waren. (Abb. 1 - 7).

Beide Präparate bewirkten 5 bis 7 Stunden nach der Fütterung die höchste Chlortetracyclin-Konzentration im Serum, wobei die Unterschiede zwischen den Präparationen AUROFAC 40 und PERCRISON 40 T minimal waren.

Der Serumspiegel der mit AUROFAC gefütterten Tiere lag zwar bei einer Dosierung von 0,8 mg CTC/kg Körpergewicht um 10 % unter dem entsprechenden Wert der "Pe.-Tiere" (Abb. 1 und 2), während bei der Zufütterung von 1,0 mg CTC/kg Körpergewicht die Serumwerte der "Au.-Tiere" um 14 % über den Werten der "Pe.-Kälber" lagen (Abb. 3 und 4).

Der gleiche Unterschied von 14 % blieb bei der Dosierung von 4,0 mg CTC/kg Körpergewicht bestehen (Abb. 5 und 6).

Nach Erreichen eines maximalen CTC-Serumspiegels erfolgte eine schnelle Abflutung der CTC-Spiegel innerhalb von 10 - 14 Stunden auf Werte um 0,02 - 0,04 mcg CTC/ml. Von diesem Zeitpunkt an verlief die CTC-Endausscheidung beider Präparate mit

hochgradigen Schwankungen. Diese Verhältnisse werden weiter unten eingehend besprochen.

Der in Versuch III. A. 4. (Abb.7) durchgeführte Vergleich der Chlortetracyclin-Serumspiegel nach einer Dauerverabreichung über 5 Tage zeigte ebenfalls keinen nennenswerten Unterschied der Blutserumwerte nach Verabreichung der zwei CTC-Präparationen.

Die Serumwerte der mit AUROFAC 40 gefütterten Tiere stiegen nach der zweiten Mahlzeit auf 0,21 mcg CTC/ml, während die der Vergleichstiere (PERCRISON 40 T) zu der gleichen Zeit erst 0,13 mcg CTC/ml Serum betrugen. Am zweiten Tag (nach der 3. Mahlzeit) betrug die Differenz der durchschnittlichen Serumspiegel nur 0,02 mcg CTC/ml (Pe. - 0,16 mcg CTC/ml, Au. - 0,18 mcg CTC/ml). Von dieser 3. Mahlzeit an lagen alle Einzelwerte um 0,15 mcg CTC/ml (+ 30 %) (s. Abb. 7).

Diskussion des Versuchsabschnittes B

Nachdem durch die vorangegangenen Versuche feststand, daß die beiden Chlortetracyclin-Präparationen keine unterschiedlichen Serumspiegel hervorrufen, wurde in den nun folgenden Versuchen nur noch eines dieser Erzeugnisse, nämlich PERCRISON 40T eingesetzt.

Die im Versuch III. B. 1. durchgeführte 1000 mg CTC/Tier-Dosierung sollte die zu erwartenden Serumspiegel nach einer therapeutischen, peroralen Verabreichung zeigen. Dabei wurde ein Durchschnittswert in der 7. Stunde nach Verabreichung von 1,17 mcg CTC/ml Serum erfasst. (Einzelwerte s. Tab. 1).

Bei einer Betrachtung der Einzelergebnisse fällt auf, daß die Höhe der Serumspiegel sich weitgehend unabhängig vom Körpergewicht, d.h. der auf kg Kgw. umgerechneten CTC-Dosis, verhalten. So zum Beispiel hat das Tier Nr. 2, mit einer Zufütterung von 8,3 mg CTC/kg Kgw., einen 7-Stunden Serumwert von 1,90 mcg CTC/ml und das Tier Nr. 3, mit einer Zufütterung von 12,5 mg CTC/kg Kgw., zur gleichen Stunde einen Wert von nur 0,50 mcg CTC/ml. Das Tier Nr. 2 war dabei in einem besseren Gesundheitszustand als das Tier Nr. 3, welches lang dauernde Diarrhöen zeigte und schwächer war. Diese Beobachtungen sind im Laufe der Versuche auch an anderen Tieren gemacht worden. Demnach scheint die Höhe der Blutserumkonzentration auch vom Gesundheitszustand, namentlich des Verdauungsapparates, abhängig zu sein.

Wenn jedoch der Gesundheitszustand der Tiere vergleichbar ist, so sind die Serumspiegel dosisabhängig, wobei aber keine lineare Beziehung besteht. So gibt z.B. eine Dosierung von 1,0 mg CTC/kg Körpergewicht Serumspiegel von ca. 0,1 mcg CTC/ml und eine Dosierung von 4,0 mg CTC/kg Körpergewicht solche um 0,30 mcg CTC/ml (s. Abb. 3;4 und 5;6).

Für das Kalb liegen in der Literatur keine vergleichbaren Daten vor. Aus dem Bereich der Humanmedizin kann auf die zusammenfassenden Darstellungen von Walter / Heilmeyer (34) und Brunner / Meachek (61) verwiesen werden. Die Ergebnisse der Arbeiten von C. Simon, W. Stille und F. K. Schattanner (62) gleichen denen der erst angeführten Autoren. Hiernach werden beim Menschen nach peroraler Verabreichung

von 4 mg CTC/kg Kgw. Blutspiegel in der Größenordnung von 0,4 - 1,8 mcg/ml erreicht. Beim Kalb ergibt die gleiche Dosierung 0,26 - 0,35 mcg CTC/ml Serum (Abb. 5 und 6). Auch beim Schwein werden nach peroraler Verabreichung von 5 mg CTC/kg Kgw. 1,8 mcg CTC/ml als Höchstwert bestimmt (M a i e r (63)). Die Höchstwerte liegen außerdem beim Menschen 2 - 5 Stunden, beim Kalb jedoch erst 5 - 7 Stunden nach der Verabreichung.

Im Versuchsabschnitt B wurde auch der Unterschied der zweimaligen zur dreimaligen Futterverabreichung bei gleichbleibender CTC-Gesamtmenge überprüft. Aus Abbildung 9 ist ersichtlich, daß der Unterschied der Versuchsgruppen am zweiten Tag 0,06 mcg CTC/ml Serum betrug. Die im 8-Stundenrhythmus gefütterten Tiere erreichten dabei den höheren Wert (0,22 mcg CTC/ml Serum). Die Serumspiegel der beiden Versuchsgruppen trafen sich am dritten Tag bei 0,20 mcg CTC/ml Serum, um am vierten Tag auf 0,15 mcg CTC/ml abzusinken.

Im weiteren Verlauf schwanken die Serumspiegel beider Präparate ($\pm 20\%$) um diesen Wert von 0,15 mcg CTC/ml. Somit wird die Höhe der Blutspiegel vom Fütterungsintervall nicht beeinflusst.

Diskussion des Versuchsabschnittes C:

Persistierende Chlortetracyclin-Serumspiegel und CTC-

Verabreichungen in den Pansen

Von Bedeutung ist die Frage, von welchem Zeitpunkt an nach dem Absetzen der Antibiotica-Fütterung im Serum der Tiere keine antibakteriellen Aktivitäten mehr aufgefunden werden. Aus den im Versuch III. C. 1. und in Abbildung 10 dargestellten Ergebnissen geht hervor, daß die persistierenden Serumspiegel unverhältnismäßig großen Schwankungen unterliegen. 20 Stunden nach der letzten CTC-haltigen Fütterung wurde ein Niveau von 0,03 mcg CTC/ml erreicht. In der Folgezeit ergab sich aber keine weitere kontinuierliche Abnahme der antibakteriellen Aktivität, sondern die Werte stiegen zum Teil wieder an. Der überwiegende Teil der Messergebnisse lag nur wenig über der Erfassbarkeitsgrenze. Zum Beispiel lagen von insgesamt 236 Messungen 117 zwischen 0,01 und 0,09 mcg CTC/ml Serum (vergleiche III. C. 1.). Davon waren nur 25 Werte zwischen 0,05 und 0,09 mcg CTC/ml Serum. Der Rest, 92 Werte, befand sich in dem Bereich von 0,01 - 0,04 mcg CTC/ml Serum. Immerhin traten aber 50 - 80 Stunden nach Absetzen wieder Chlortetracyclin-Serumkonzentrationen auf, deren Höchstwerte 0,20, 0,16, 0,12 mcg/ml in der 60. Stunde und beispielsweise 0,09 mcg/ml in der 72. Stunde betrugen. In Abbildung 10 wurde der Verlauf der Serumspiegel von der 20. bis zur 130. Stunde einschließlich der Meßwertstreuung zu den einzelnen Zeitpunkten dargestellt. Die unverhältnismäßig lang andauernden

Schwankungen der Serumspiegel nach längst erfolgtem Abfluten der Hauptaktivität scheint uns für das Kalb spezifisch zu sein. Entsprechende Ergebnisse bei anderen Spezies sind nicht bekannt.

Systematische Untersuchungen der CTC-Serumkonzentrationen in diesem Zeitabschnitt nach nutritiver Verabreichung wurden bisher nicht durchgeführt. M e y n, K a l i c h und M e r k e n s c h l a g e r (64) stellten an 6 Kälbern 15 Stunden nach Absetzen eines Milchaustauschfutters, das ca. 60 % unserer nutritiven CTC-Dosis enthielt (1,4 mg CTC/kg Kgw. am Tag), keine antibakterielle Aktivität im Serum fest. Bei dieser Untersuchung handelte es sich aber um einen Infektionsversuch mit Salmonella dublin, wodurch die Resorptionsfähigkeit der Versuchstiere sicherlich beeinflusst war.

Nach therapeutischer peroraler Dosierung (1500 mg CTC/Tier) fanden die oben genannten Autoren 36 Stunden nach der Verabreichung 0,36 mcg CTC/ml (0,04 - 0,78 mcg/ml). Unsere vergleichbaren Werte nach 1000 mg CTC/Tier (per os) lagen in der 32. Stunde noch bei 0,16 mcg CTC/ml (Tab. 1). Die einzige Mitteilung, in der über länger anhaltende Chlortetracyclin-Serumspiegel berichtet wird, stammt von B o r t r e e und S h o o k (65). Sie stellten 92 Stunden nach einer peroralen CTC-Gabe von 22 - 34 mg CTC/kg Körpergewicht noch einen Gehalt von 0,1 - 0,5 mcg CTC/ml Serum fest. Diese Dosierung liegt um mehr als das Doppelte über unserer höchsten peroralen Dosis.

Um eine Erklärung für die persistierenden CTC-Spiegel zu finden, wurden Untersuchungen über den eventuellen diesbe-

züglichen Einfluß des Pansens angestellt (III. C. 2. a und b). Ein Zusammenhang zwischen länger anhaltenden CTC-Serumspiegeln nach peroraler Verabreichung und der Funktion des Pansens wurde durch die Ergebnisse des Versuches III. C. 2. (intraruminale Infusion von 0,4 mg CTC/kg Körpergewicht) angedeutet. In diesem Versuch (a) kam es zu den gleichen CTC-Serumspiegeln von 0,01 - 0,04 mcg CTC/ml, wie sie 20 - 85 Stunden nach einer peroralen Verabreichung von 100 mg CTC/kg Milchaustauschfutter beobachtet wurden.

Der Versuch (a), mit der zehnfachen Dosierung wiederholt (III. C. 2. b und Abb. 11) zeigte, daß es nicht zu dem gewohnten Resorptionsbild mit steiler An- und Abflutung (Abb 1-6) kommt.

Wurde nach peroraler Verabreichung der maximale Serumspiegel in der 5. - 7. Stunde ermittelt, so ist das nach intraruminaler Infusion nicht der Fall. Hier wurde der Höchstwert der CTC-Serumspiegel erst nach 19 - 24 Stunden erreicht. Die Abflutung verlief ähnlich wie bei anderen Versuchen mit größeren Schwankungen über einen längeren Zeitraum hinweg (vergleiche dazu Abb 10, Tab. 2 und Abb. 11).

Im Laufe der Untersuchungen wurde festgestellt, daß vor allem die Kälber, deren Körpergewichte zwischen 75 und 120 kg lagen, die extrem langanhaltenden CTC-Serumspiegel aufwiesen (III. C. 1.). Dieser Tatbestand führt zu folgender Überlegung: Bei den jungen Kälbern funktioniert der Schlundrinnenreflex so, daß keine nennenswerten Anteile der Tränkeflüssigkeit in die Vormägen gelangen. Der Resorptionsgeschwindigkeit entsprechend steigt der CTC-Gehalt 5 - 7 Stunden lang im Blut an. Nach einer 30 - 40 Stunden dauernden Abflutung, verschwindet die CTC-Aktivität.

Offensichtlich beginnt aber in einem bestimmten Alter (das einem Körpergewicht von ca. 75 kg entspricht) eine physiologische Umstellung, die dazu führt, daß größere Anteile der Tränkeflüssigkeit direkt in den Pansen gelangen. Durch die beginnenden Vormagenkontraktionen wird jetzt die Tränkeflüssigkeit schubweise in den Labmagen geschickt. Diese Vorstellungen könnten sowohl das langsame Anfluten (20 - 24 Stunden) als auch die extrem lange Verweildauer des Antibioticums im Serum erklären. Auch die hochgradigen CTC-Konzentrationsdifferenzen, die bis 85 Stunden nach Absetzen des Antibioticums im Serum festgestellt wurden, sprechen für eine schubweise Überführung der aktiven Substanz in die resorptionsfähigen Bereiche.

Es liegt nahe zu vermuten, daß die beschriebene Umstellung durch die Aufnahme fester Nahrung stimuliert wird. In dem oben genannten Alter begannen nach unserer Beobachtung alle Kälber die Holzplanken der Boxen intensiv zu benagen.

Weiterhin kann angenommen werden, daß mit fortschreitender Entwicklung der Kälber die Pansenkontraktionen häufiger und regelmäßiger werden. Dadurch könnte es bei den älteren Tieren (>120 kg Kgw.) zu einer ausgeglichenen Abflutung der vorhandenen Serumspiegel kommen.

ZUSAMMENFASSUNG

Nach Verabreichung von Chlortetracyclin-haltigem Milchaustauschfutter wurden die Chlortetracyclin-Serumspiegel von Saugkälbern untersucht. Die Untersuchungen wurden in drei Abschnitte gegliedert.

A. Im ersten Teil wurde untersucht, ob AUROFAC 40 - ein Chlortetracyclin-haltiger Cake - und PERCRISON 40 T - ein kristallines Chlortetracyclin-Präparat - in Milchaustauschfutter an Saugkälber verabreicht, in der An- und Abflutung der Chlortetracyclin-Serumspiegel unterschiedliche Verlaufskurven ergeben. Zu diesem Zweck wurden die beiden CTC-Präparationen in verschiedenen Konzentrationen in das Milchaustauschfutter eingemischt. Folgende Konzentrationen wurden hergestellt: 80, 100 und 400 mg CTC/kg Milchaustauschfutter. In dieser Reihenfolge wurden nach einmaliger Verabreichung eines Percrison- bzw. Aurofac-haltigen Milchaustauschfutters folgende Maximalwerte 5 - 7 Stunden nach der Fütterung ermittelt:

Percrison - 0,10, 0,12, 0,29 mcg CTC/ml Serum

Aurofac - 0,09, 0,14, 0,31 mcg CTC/ml Serum.

Weiterhin wurden CTC-Spiegel im Serum nach einer länger dauernden Verabreichung der beiden CTC-Präparationen untersucht. Sowohl Percrison 40 T als auch Aurofac 40 wurden in einer Konzentration von 100 mg CTC/kg Milchaustauschfutter fünf Tage lang (10 Mahlzeiten) verabreicht. Die so erzielten CTC-Serumspiegel zeigten keine grundsätzlichen quantitativen Differenzen.

Im Versuchsabschnitt B wurde die Höhe der Chlortetracyclin-Serumspiegel nach verschiedenartiger Applikation und unterschiedlicher Dosis von PERCRISON 4oT, an Kälber verabreicht, bestimmt.

1000 mg CTC/Tier (8,3 - 14,3 mg CTC/kg Körpergewicht), die über eine CTC-freie Milchaustauschfuttertränke einmalig verabreicht wurden, ergaben nach sieben Stunden Werte von 0,50 - 2,10 mcg CTC/ml Serum.

2 mg CTC/kg Körpergewicht, intravenös verabreicht, führten zwei Stunden nach der Applikation zu 0,70 mcg CTC/ml Serum. Der Spiegel nach intravenöser CTC-Verabreichung fällt bedeutend schneller ab als nach peroraler Applikation (Abb. 7 Tab. 1).

Die Verteilung der Tagesration eines Milchaustauschfutters mit 100 mg CTC/kg auf zwei bzw. auf drei tägliche Mahlzeiten ergab bei den dreimal gefütterten Tieren am zweiten Tag um 0,05 mcg CTC höhere Werte pro ml Serum. Vom dritten Tag an unterschieden sich die CTC-Serumspiegel (je 0,15 mcg/ml) nicht mehr.

Im Versuchsabschnitt C wurden die Chlortetracyclin-Serumspiegel nach längerer Vorfütterung von 100 mg CTC/kg Milchaustauschfutter in der Zeit von der 20. - 130. Stunde nach der letzten Verabreichung untersucht.

Dabei wurde festgestellt, daß bis zur 86. Stunde eine antibakterielle Aktivität im Serum auftreten kann. Die ermittelten Chlortetracyclin-Serumkonzentrationen lagen in solchen Fällen zwischen 0,01 - 0,20 mcg CTC/ml. Die Herkunft dieser

CTC-Serumwerte wurde im Zusammenhang mit zwei weiteren Versuchen, die eine direkte Verabreichung des Chlortetracyclins in den Pansen zum Inhalt hatten, diskutiert. Die lange nach Abfluten der Hauptaktivität persistierenden CTC-Serumkonzentrationen rührten offensichtlich aus der protrahierten Resorption von CTC-Anteilen, die während des Tränkaktes in den Pansen geflossen sind und aufgrund nachfolgender Pansenkontraktionen verspätet in den Labmagen und Dünndarm gelangten, um erst dann resorbiert zu werden.

SUMMARY

The CTC-serum-levels of milk calves were examined after feeding them with CTC-milk replacer. The examinations were classified in three sections:

A. In the first section there was analysed whether AUROFAC 4o (a CTC-cake) and PERCRISON 4oT (a crystal-line CTC-preparation), by including them in milkreplacer and feeding the calves, show different curves in increasing and decreasing of the CTC-serum-levels. For this purpose the two CTC-preparations were mixed into the milkreplacer in various concentrations. The following mixtures have been prepared: 8o; 1oo; and 4oo mg CTC/kg milkreplacer. In this same sequence after feeding once Percrison- respectively Aurolac milkreplacer mixtures the following maximum values have been obtained after a period of 5 - 7 hours:

Percrison - o,1o; o,12; o,29 mcg CTC/ml serum

Aurolac - o,09; o,14; o,31 mcg CTC/ml serum.

Furthermore the CTC-levels in the serum were examined after a longer continuance of feeding milkreplacer including the two preparations. Both P 4oT and A 4o have been given during five days in a concentration of 1oo mg per CTC/kg milkreplacer (1o feedings). The resulting CTC-serum-levels on principle did not show quantitative differences.

In the section B of the experiments the value of the CTC-serum-levels was determined after various applications and different doses of P 4oT fed to calves.

1ooo mg CTC/animal (8,3 - 14,3 mg CTC/kg weight) fed once, shew after 7 hours values of o,5o - 2,1o mcg CTC/ml serum.

Intravenous applications of 2 mg CTC/kg weight shew two hours later 0,70 mcg CTC/ml serum. The level decreases considerably faster after intravenous application of CTC than it does after peroral application (fig. 7, index 1).

The comparison between the CTC-serum-levels after feeding the animals resp. three times with the same total quantity (100 mg CTC/kg milkreplacer) shew on the second day increased serum-levels on the calves fed three times (+ 0,05 mcg CTC/ml). From the third day on the serum-levels compared between the two feeding procedures did almost not show any differences (0,15 mcg CTC/ml serum = $\pm$ 20%).

During the experimental section C the CTC-serum-levels were examined after a longer pre-feeding period of 100 mg CTC/kg milkreplacer - 20 to 130 hours following the last feeding.

There was found out that a certain antibacterial activity in the serum can taken place up to the 86-th hour. The determinated CTC-serum-concentrations were in such cases of 0,01 to 0,20 mcg CTC/ml. The origin of those CTC-serum-levels was discussed in connection with two other experiments, which concerned a direct application of CTC into the rumen. The CTC-serum-concentrations persisting after decreasing of the main activity have their origin apparently in the protracted reabsorption of CTC particles, which were flowing into the rumen and because of subsequent contractions of the rumen reached only with delay the rennet bag and small intestine to be then reabsorbed.

A B B I L D U N G E N

Zeichenerklärung:

Ordinate: Gehalt an Chlortetracyclin in $\mu\text{g/ml}$ Serum

Abszisse: Zeitpunkt der Blutprobenentnahme

In Abbildung 7 und 10: Zeitpunkt der Fütterung.

Die Entnahme der Blutprobe erfolgte in diesen Fällen jeweils 7 Stunden nach der eingezeichneten Fütterung. Der Übersichtlichkeit wegen wurden aber die Fütterungs- und Meß-Zeitpunkte synchron eingezeichnet.

—
—

-.-.-.-.-
Arithmetische Mittelwerte der CTC-Serumspiegel
der am Versuch beteiligten Tiere

• ○
 △
■ □
Einzelwerte der Versuchstiere

Abb. 10:  Standardabweichung

Abb. 11: △ ○ sind arithmetische Mittelwerte der 7 Versuchstiere

Die Abbildungen mußten in verschiedenen Maßstäben dargestellt werden.

Abbildung 1 und 2: Chlortetracyclin-Serumkonzentrationen nach Verabreichung von 80 mg Percrison bzw. Aurofac pro kg Milchaustauschfutter.

Anzahl der Kälber: 4

Körpergewicht: 80-120 kg

Einmalige Verabreichung

(= 0,8mg CTC/kg Kgw)

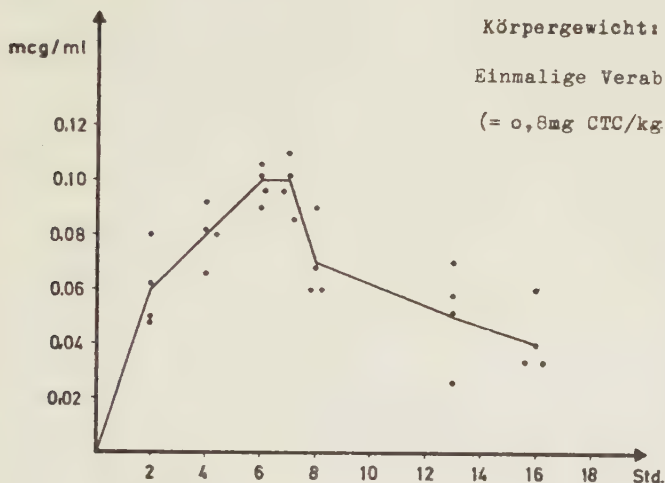


Abb.1 Percrison

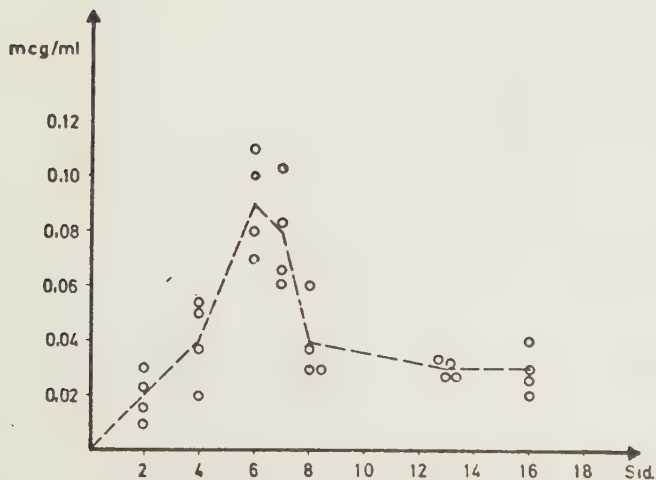


Abb.2 Aurofac

Abbildung 3 und 4: Chlortetracyclin-Serumkonzentrationen nach Verabreichung von 100 mg Percrison bzw. Aurofac pro kg Milchaustauschfutter.

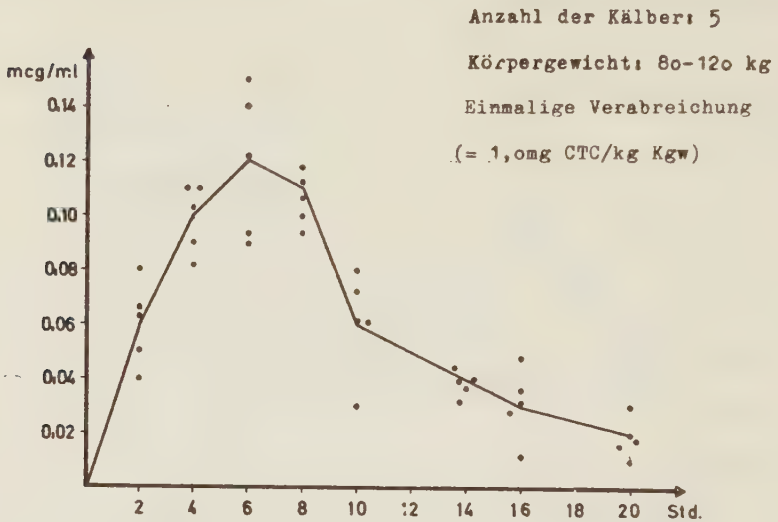


Abb.3 Percrison

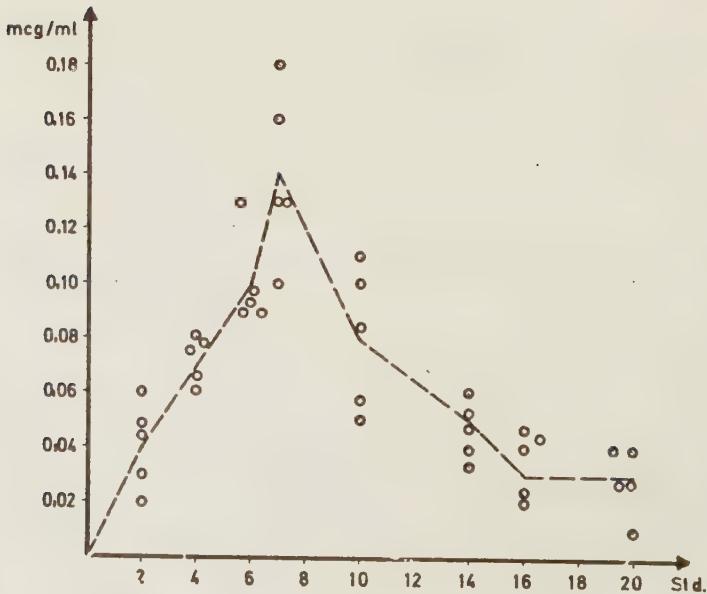


Abb.4 Aurofac

Abbildung 5: Chlortetracyclin-Serumkonzentrationen nach
Verabreichung von 400 mg Percrison pro kg Milchaustausch-
futter.

Anzahl der Kälber: 4

Körpergewicht: 50 kg

Einmalige Verabreichung

(= 4,0 mg CTC/kg Kgw)

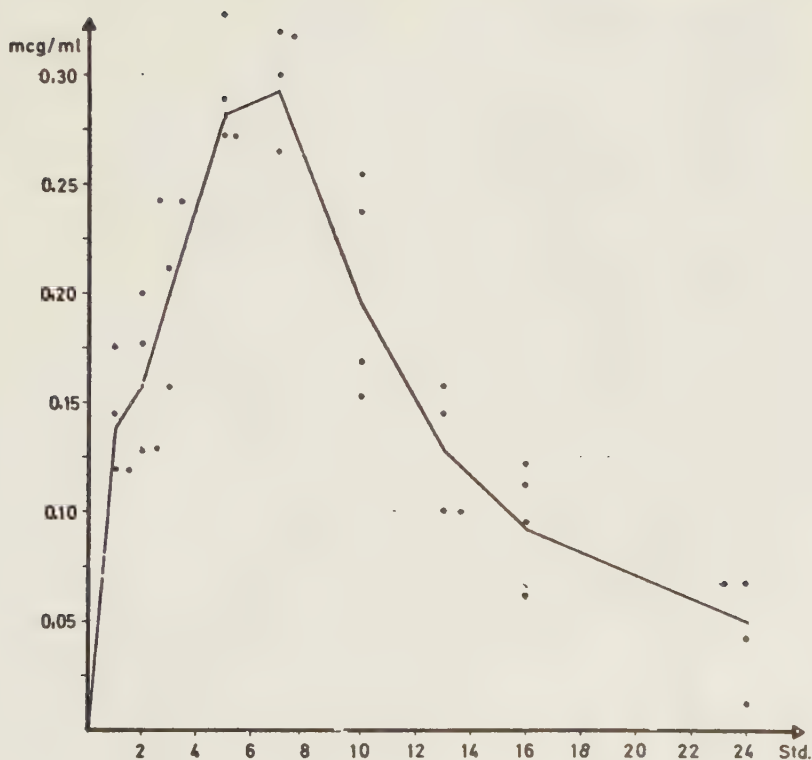


Abb.5 Percrison

Abbildung 6: Chlortetracyclin-Serumkonzentrationen nach
Verabreichung von 400 mg Aurofac pro kg Milchaustausch-
futter.

Anzahl der Kälber: 4

Körpergewicht: 50 kg

Einmalige Verabreichung

(= 4,0 mg CTC/kg Kgw)

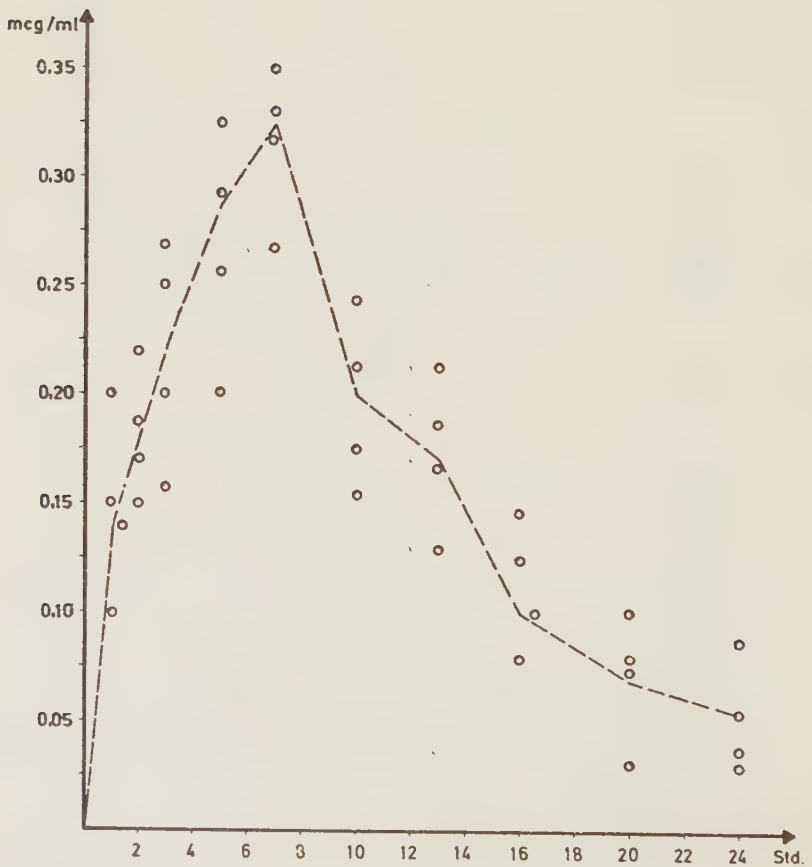


Abb. 6 Aurofac

Abbildung 7: Chlortetracyclin-Serumkonzentrationen nach Verabreichung von 100 mg CTC/kg Milchaustauschfutter zweimal täglich . (pro Tag 2mg CTC/kg Kgw)

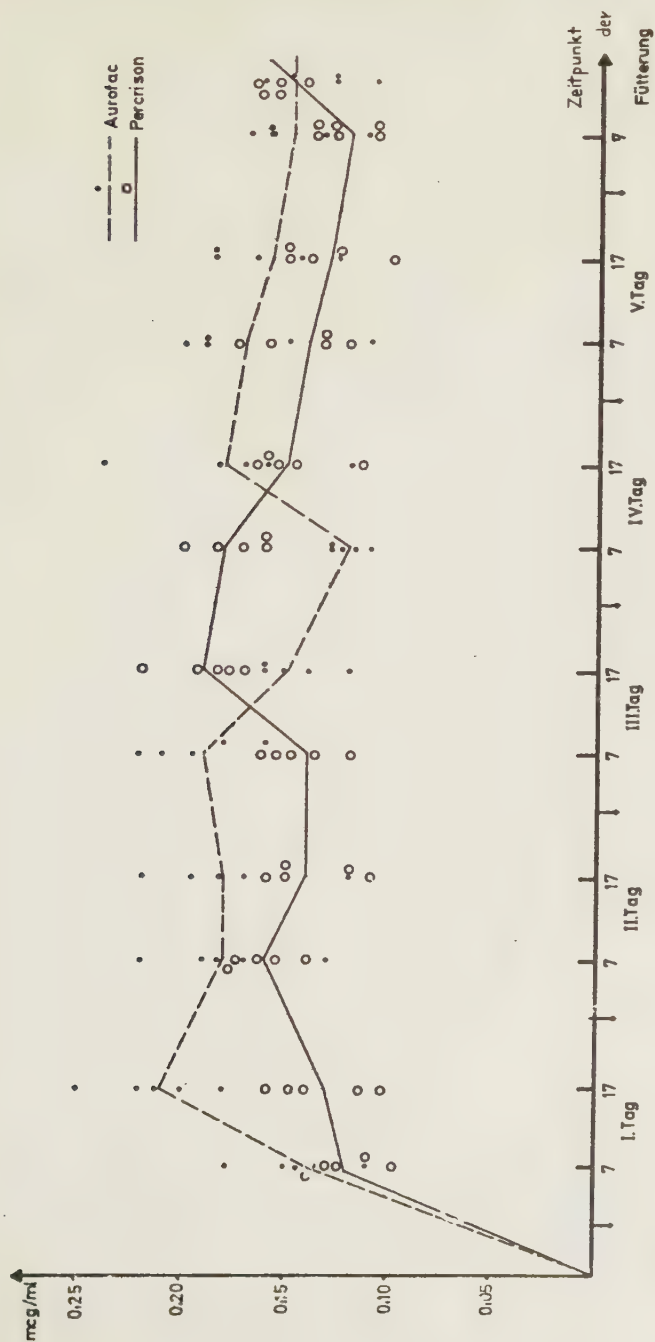


Abb. 7

Abbildung 8: Vergleich der Chlortetracyclin-Serumkonzentrationen nach Verabreichung von:

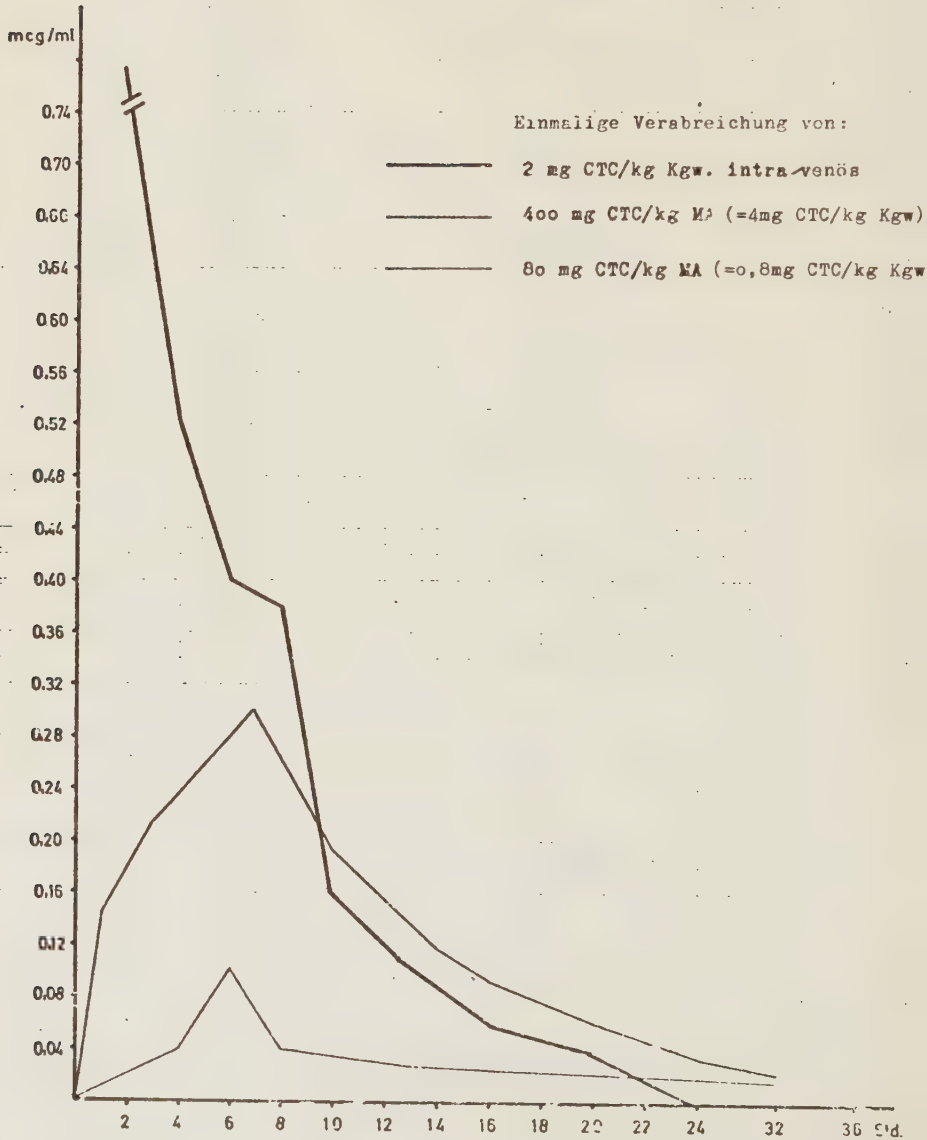


Abbildung 9 : Chlortetracyclin-Serumkonzentrationen nach Verabreichung von 100 mg CTC/kg Milchaustauschfutter.

△ Fütterung zweimal täglich (7 Kälber)

○ Fütterung dreimal täglich (7 Kälber)

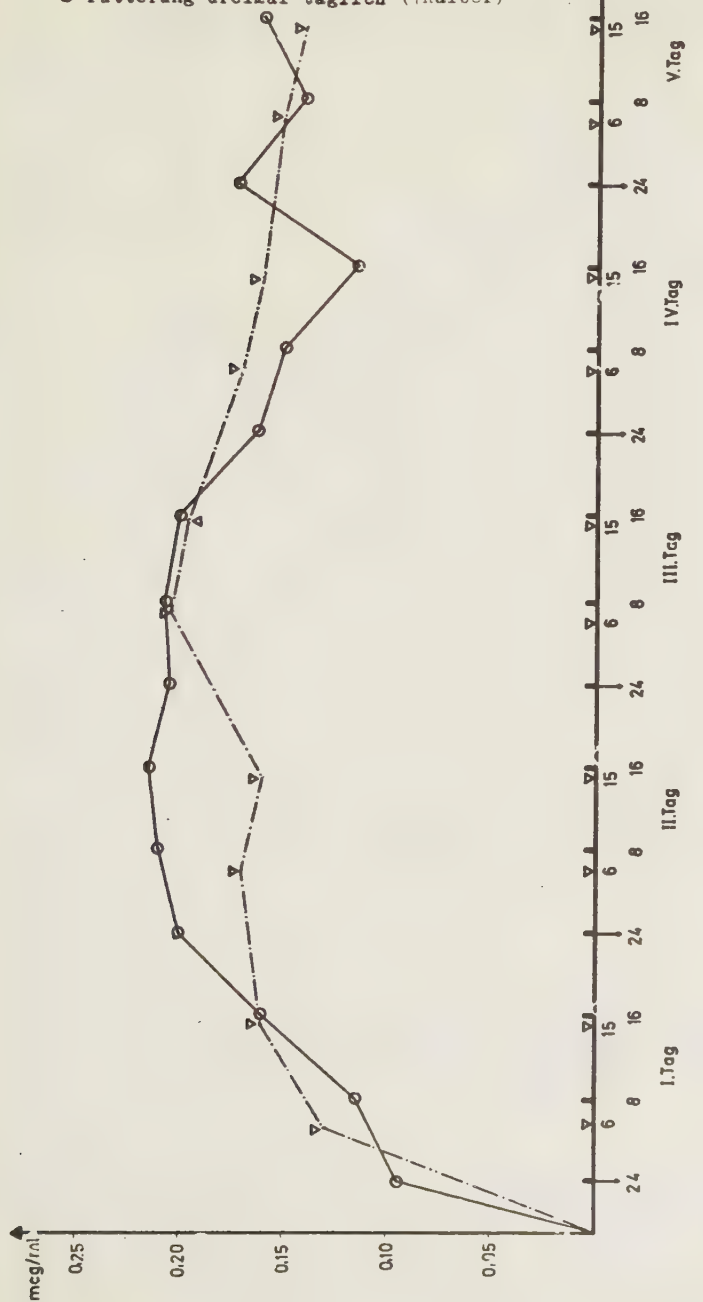


Abb. 9

Abbildung 10: Chlortetracyclin-Serumkonzentrationen (nach Vorfütterung von 100 mg CTC/kg Milchaustauschfutter) 20-130 Stunden nach der letzten Fütterung.

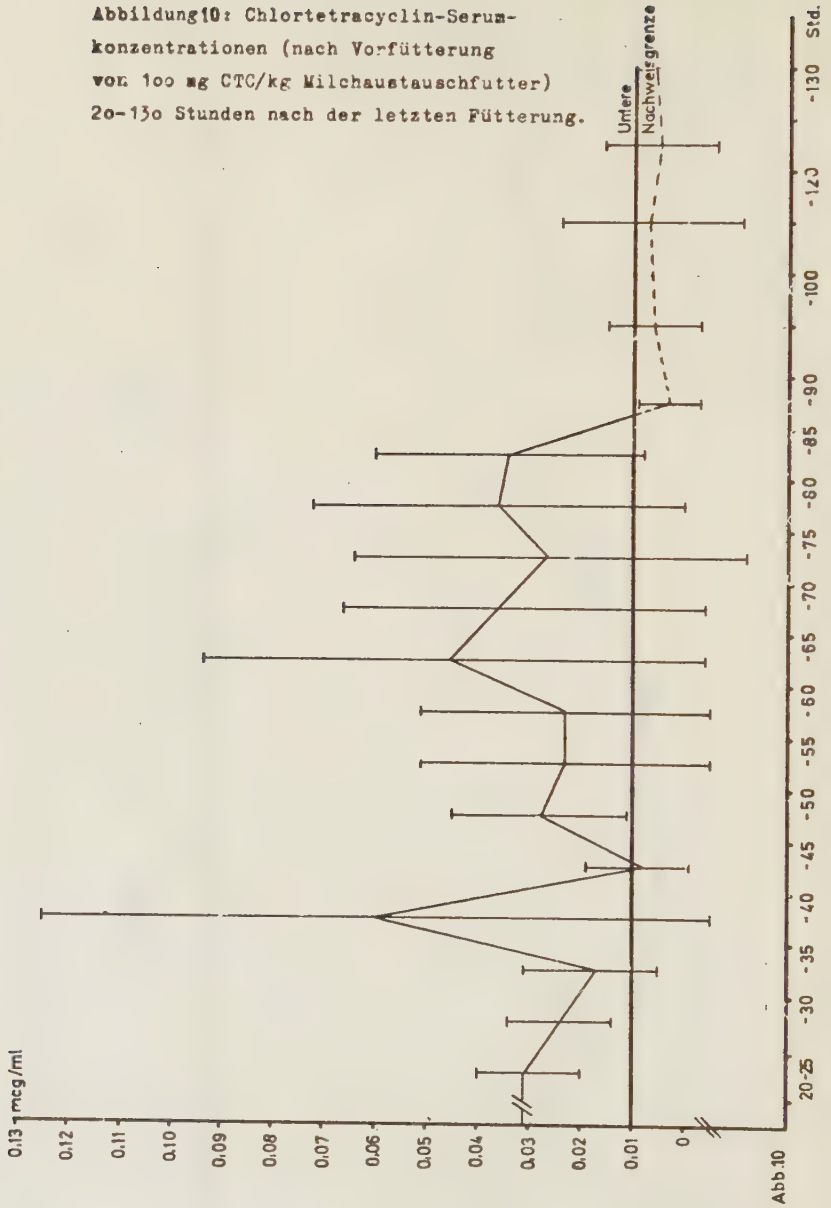


Abb. 10

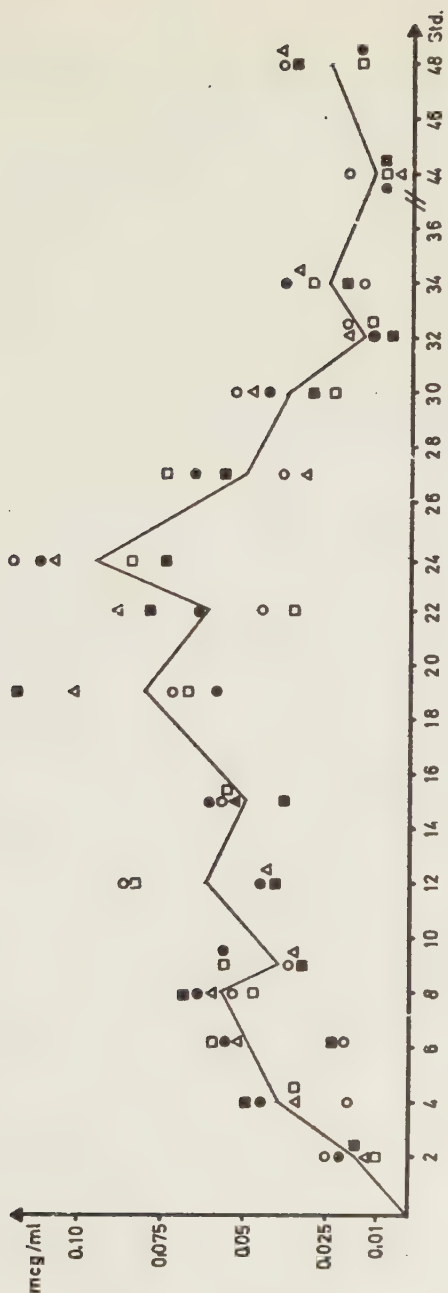


Abb. 11

Chlortetracyclin-Serumkonzentrationen nach Verabreichung von 40 mg CTC/kg Körpergewicht in den Pansen.

Anzahl der Tiere: 5

LITERATURVERZEICHNIS

- 1 Moore, R.P., Evenson, A., Luckey, T.D., Coy, E. Mc., Elvehjem, C.A. and Hart, E.B.: J. Biol. Chem. 165, 437 (1946)
- 2 Stokstad, E.L.R., Jukes, Th.H., Pierce, J., Page, A.C. Jr., Franklin, A.L.: J. Biol. Chem. 180, 647 (1949)
- 3 Brüggemann, J.: Umschau in Wissenschaft und Technik 21, 641-644 (1959)
- 4 Jukes, T.H.: Antibiotics in Nutrition, Med. Enceyl. New York (1955)
- 5 Stokstad E.L.: Physiol. Rev. 34, 1, (1954)
- 6 Lassiter, C.W.: J. Dairy Sci. 38, 1102 (1955)
- 7 Brüggemann, J., Zucker, H.: Z. f. Tierernährung und Futtermittelkunde, 11, 65 (1956)
- 8 Forbes, M., Supples, W.C., Combs, G.F.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 92, 110, (1958)
- 9 Merckenschlager, M., Lösch, U., Riedel, G.: Tierärztliche Umschau 22, 132, (1967)
- 10 Haenel, H.: Ernährungsforschung. 4, 500, (1959)
- 11 Romoser, G.L., Shorps, M.S., Gombs, G.F.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 83, 17, (1953)
- 12 Sieburth, J.M., Jezeski, J.J., Hill, E.G.; Carpenter, L.E.: Poultry Sci. 33, 753, (1954)

- 13 Price, K.E., Zolli, Z., Hardie, W.P., Gallian, M.J.:
Poultry Sci. 36, 219 (1957)
- 14 Lih, H., Baumann, C.A.: J. Nutr. 43, 565, (1951)
- 15 Teeri, A.E., Gannis, P.M., Ringrose, R.C.:
Poultry Sci. 38, 360, (1959)
- 16 Melnykowycz, J. and Johansson, K.R.: J. Exp. Med.
101, 507, (1955)
- 17 Michel, M., Francois, A.: Compt. rend. Seance l. Acad.
d. Sci., 242, 1770, (1956)
- 18 Jukes, T.H.: Feedstuffs, 42, 27-29, (1970)
- 19 Watanabe, T. und Watanabe, M.: Igaku to Seibutsu-
gaku, 79, 143, (1959)
- 20 Anderson, E.S. und Datta, N.: Lancet, 1, 407-409
(1965)
- 21 Smith, H.W. und Halls, S.: J. Brit. Med., 1,
266-269, (1966)
- 22 Walton, J.R.: Lancet, 2, 1300-1302, (1966)
- 23 Jarolmen und Kemp, G.: J. of Bacteriol., 99,
487-490, (1969)
- 24 Smith, H.W.: J. Med. Microbiol., 3, 165-180, (1970)
- 25 Catron, D.V., Maddock, H.M., Speer, V.C., Vohs, R.L.:
Antibiot. Chemotherapy. 1, 31, (1954)
- 26 Coates, M.E., Dickinson, C.D., Harrison, G.F.,
Kon, S.E., Cummins, S.H., Cuthbertson, W.F.:
J. Sci. Food Agr. 3, 43, (1952)

- 27 Forbes, M., Park, J.T.: J. Nutrition. 67, 69 (1959)
- 28 Schole, J.: Habilitationsschrift (1966) München
- 29 Brüggemann, J., Merckenschlager, M., Schmidt, H.,
Riedel, G., Schöle, J.:
Zeitschrift für Tierphysiologie, Tierernährung und
Futtermittelkunde. 25, 321-332 (1969)
- 30 Brüggemann, J., Karg, H., Schole, J.:
Vitamine und Hormone. 1, 338, (1956)
- 31 Duggar, B.M.: Ann. N.Y. Acad. Sci., 51, 177, (1948)
- 32 Finlay, A.C., Hobby, G.L., Pan, S.Y., Regna, P.P.,
Routien, J.B., Seely, D.B., Shull, G.M., Sobin, B.A.,
Solomous, I.A., Vinson, J.W., Kone, J.H.: Science,
111, 85, (1950)
- 33 Stephens, C.R., Conover, L.H., Pasternak, R., Hochstein,
F.A., Moreland, W.T., Regna, P.P., Pilgrim, F.J.,
Brunings, K.J., Woodward, R.B.: J. Ann. Chem. Cos.
76, 3568, (1954)
- 34 Walter/Heilmeyer: Antibiotica Fibel, Georg Thieme Verlag,
Stuttgart, (1965)
- 35 Frank, A., Riedl, K.: in Brunner/Machek: Die Anti-
biotica, 1, 314, (1962)
- 36 Korzybski, T., Kurylowicz, W.: Antibiotica SG 361 (1961)
VEB Gustav Fischer Verlag Jena
- 37 Robson, J.M., Stacey, R.S.: Recent Advances in Pharma-
cology, 3. Edition, S. 335 (1962)

- 38 Kraushaar, A.: in Brunner/Machek: Die Antibiotica,
1, 484, (1962)
- 39 Herold, M., Belik, E., Doskocil, J.: Giorn. Microbiol.,
2, 302, (1956)
- 40 Rolle, G.K., Bevelander, G., Fischer, H.: Am. J. Vet.
Res., 23, 315, (1962)
- 41 Cohan, S.Q., Bevelander, G., Tiamsic, T.: Am. J. Dis.
Child. 105, 453, (1963) New York
- 42 Titus, E.D.: Am. Chem. Soc. Abstr. of Papers 134 th
Meeting Sept. 1958
- 43 Brüggemann, J., Lösch, U., Merckenschlager, M., Ofter-
dinger, I.: Zentralblatt für Veterinärmedizin, 13,
59-74, (1960)
- 44 Knothe, H.: Zeitschr. für Tierphysiologie, Tierernährung
und Futtermittelkunde, 21, 263-326, (1966)
- 45 Milch, R.A., Rall, D.P., Tabic, J.E.:
J. Nat. Can. Inst. 19, 87, (1957)
- 46 Kelly, R.G.: J. Pharmacol. Exp. Ther., 130, 144, (1960)
- 47 Byiski, D.A., Eisner, H.J. and Kelly, R.G.: J. Pharma-
col. Exp. Ther., 130, 150-156, (1960)
- 48 Richter, R.: in Brunner/Machek (61): Die Antibiotica,
1, 585, (1962)
- 49 Eisner, H.J., Wulf, R.J.: J. Pharmacol. Exp. Ther.,
130, 150-156, (1960)

- 50 Grove, D.C., Randall, W.A.: Assay Methods of Antibiotics.
A laboratory manual, Medical.Encyclopedic Inc. N.Y. (1955)
- 51 Machek, G.: in Brunner/Machek (61): Die Antibiotica, 1,
462, (1962)
- 52 Monastero, F., Meany, A., Grenfell, T.O. and Hedger, F.M.:
J. Am. Pharmacol. A., 40, 241, (1951)
- 53 Levin, J., Garlock, E.A. Jr. and Fischbach, H.: J. Am.
Pharmacol. A., 38, 473, (1949)
- 54 Merkschlager, M.: Habilitationsschrift, 206-214 (1962)
- 55 Pichnarcik, J., Wenzel, S., Gisske, W.: Archiv für Lebens-
mittelhygiene, 20, 272, (1969)
- 56 Oberzill, W.: in Brunner/Machek (61): Die Antibiotica, 1,
454, (1962)
- 57 Coretti, K.: Fleischwirtschaft, 11, 737, (1959)
- 58 Herold, M.: Antibiotica, S. 121, VEB Deutscher Verlag
der Wissenschaften, Berlin (1956)
- 59 Brandl, E.: in Brunner/Machek (61): Die Antibiotica, 1,
376, (1962)
- 60 Schmid, A.: in Brunner/Machek (61): Die Antibiotica, 1,
419, (1962)
- 61 Brunner, R., Machek, G. (Herausgeber): Die Antibiotica,
1, 2. Teil, Verlag Hans Carl, Nürnberg (1962)

- 62 Simon, C., Stille, W.: Antibiotica Therapie; 4,
Verlag Schattauer F.K. Stuttgart - New York (1970)
- 63 Maier, K.: Wiener Tierärztl. Monatsschrift, 42,
(1955)
- 64 Meyn, A., Kalich, J., Merckenschlager, M.: Berl. und
Münch. Tierärztl. Wschr. 73, 81-87, (1960)
- 65 Bortree: Penssylv. State College School of Agriculture
Progr. Rep. 1952, Zit. nach Gratzl und Jaksch, Wiener
Tierärztl. Monatsschrift, 41, 73-88, (1954)

Dem Vorstand des Institutes für Tierphysiologie,
Herrn Professor DDr. DDr. hc. Johs. Brüggemann
möchte ich für die Überlassung des Themas und die
ausgezeichneten Arbeitsbedingungen im Institut
danken.

Auch dem Vorstand des Institutes für Ernährungs-
physiologie, Herrn Professor Dr. Dr. Tiews bin
ich für Anregungen und hilfreiche Diskussion zu
Dank verpflichtet.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. U. Lösch für
die jederzeit gewährte Unterstützung bei der Durch-
führung der Arbeit, sowie den Mitgliedern des Labors
für das gute Arbeitsklima.

Lebenslauf

Ich wurde am 30. 11. 1942 als Sohn des Kaufmanns Richard Knall und seiner Frau Gertrud Knall, geb. Barner, in Kronstadt (Rumänien) geboren.

In Kronstadt besuchte ich vom Jahre 1949 bis 1961 die Schule "Scoala medie Nr. 1 Brasov", die ich mit dem Abitur erfolgreich abschloß.

Vom Oktober 1962 bis Februar 1965 habe ich in Temeschburg (Rumänien) an dem Agronomischen Institut, Fachrichtung Tiermedizin studiert.

Im März 1965 übersiedelte ich mit meiner Familie in die Bundesrepublik Deutschland. Da mir mein Studium aus Rumänien nicht anerkannt wurde, begann ich im Sommersemester 1965 erneut Tiermedizin zu studieren.

Ich studierte an der Ludwig-Maximilians-Universität in München bis Sommersemester 1969. Das Staatsexamen beendete ich im Februar 1970. Die Bestallung als Tierarzt wurde mir am 12.3.1970 erteilt.

Während der Praktikantenzeit war ich bei Herrn Dr. med. vet. Hugo Wagner in Wolnzach.

Seit Februar 1970 bin ich im Institut für Tierphysiologie und dem Institut für Ernährung der Tiere mit der Anfertigung meiner Dissertation beschäftigt, die ich mit Vorlage dieser Arbeit beende.

